

SEGUIMIENTO MEDIANTE FISH DE BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE LA VINIFICACIÓN

Sara Callejón, Lucia Polo, Sergi Ferrer, Isabel Pardo

ENOLAB – Laboratorio de Microbiología Enológica, Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia
Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot (Valencia). 963543145. Sara.Callejon@uv.es

Resumen:

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite simultáneamente la detección y recuento directo de especies en una muestra, sin necesidad de cultivo. En este trabajo se ha empleado esta técnica para cuantificar e identificar las poblaciones de bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica (FML), y las presentes durante el envejecimiento. Los recuentos obtenidos se compararon con los procedentes de la siembra en placa, y la identificación por FISH con la identificación mediante PCR específica y 16S-ARDRA.

La única especie presente en este muestreo durante la FML y el envejecimiento de los vinos fue *O. oeni*, y la evolución de la población de esta especie variaba en función de las condiciones aplicadas al vino. Se observó una total coincidencia de los resultados de identificación tanto por FISH como por PCR específica y 16S-ARDRA. Los recuentos resultaron ser más elevados en FISH, debido al hecho de que esta técnica detecta organismos totales y no sólo las viables como en el caso del recuento en placa.

Este método es mucho más rápido para seguir la evolución de las poblaciones durante la FML al proporcionar resultados cuantitativos tiempos mucho más cortos, evitando el cultivo de los microorganismos.

Palabras clave: FISH, Fermentación Maloláctica, *Oenococcus oeni*, Bacterias Lácticas, Recuento e identificación.

1. INTRODUCCIÓN

Generalmente, el análisis de las poblaciones microbianas se circunscribe a los vinos terminados y listos para embotellar con el fin de estimar el riesgo de alteración durante el periodo de comercialización. Sin embargo, es importante conocer la evolución de la microbiota autóctona a lo largo del proceso de vinificación y envejecimiento del vino, para predecir con suficiente antelación los cambios beneficiosos o perjudiciales que pueda sufrir el vino como consecuencia del crecimiento microbiano.

Entre las bacterias que existen en el vino están las bacterias lácticas, responsables de la (FML) pero también de diversas alteraciones del vino. En cuanto a las bacterias lácticas (BAL) responsables de la FML la más conocida es *Oenococcus oeni* que se multiplica en el vino al final de la fermentación alcohólica para transformar el ácido málico en ácido láctico. Entre las alteraciones más conocidas producidas por las BAL destaca el aumento de la acidez volátil.

Asimismo, al final de la FML las bacterias aún vivas atacan el ácido cítrico del vino para producir acidez volátil y diacetilo. El género *Oenococcus* es el que, generalmente predomina en los vinos y parece ser el más adaptado para realizar la FML minimizando los riesgos. Pero el predominio de *Oenococcus* sobre otras especies de BAL no es sistemático y no es raro que, en ausencia de control, se pueda asistir a una FML ligada al desarrollo de bacterias lácticas indeseables (*Lactobacillus*, *Pediococcus*), responsables de defectos organolépticos.

De todo ello surge la necesidad de un método rápido capaz de detectar y cuantificar la microbiota propia del vino durante todo el proceso de vinificación:

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite simultáneamente la detección y recuento

directo de especies en una muestra, sin necesidad de cultivo. La técnica se basa en la hibridación de sondas específicas fluorescentes con rRNA 16S (diana). El complejo sonda-diana se puede visualizar con el microscopio de fluorescencia.

En este trabajo se ha empleado esta técnica para cuantificar e identificar las poblaciones de BAL responsables de la FML, y las presentes durante el envejecimiento.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se emplearon vinos de Tempranillo y Cabernet-Sauvignon procedentes de la D.O. Somontano. Procesamos las muestras tomadas a lo largo de la fermentación y durante el envejecimiento del vino, y se analizaron en paralelo utilizando la técnica de FISH [1] y el crecimiento en placas de MRS y MLO durante 4-6 días a 28°C con posterior identificación mediante 16S-ARDRA [2] y PCR específica [3].

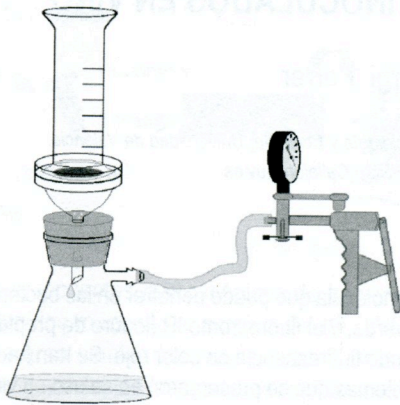
Para el recuento de bacterias fijadas por hibridación *in situ* se utilizó un programa de análisis de imagen automatizado llamado CellC@ [4].

2.1. Protocolo FISH:

- 1.- Filtración de la muestra para su recogida en filtro de policarbonato
- 2.- Fijación celular mediante deshidrataciones seriadas en etanol (50, 80, 96%)
- 3.- Permeabilización mediante la adición de lisozima
- 4.- Adición al filtro de tampón de hibridación y sonda
- 5.- Incubación en una cámara húmeda a una temperatura y tiempo determinados en función de la sonda
- 6.- Lavado del filtro en tampón atemperado para eliminar uniones inespecíficas
- 7.- Lavado del filtro agua filtrada estéril



Fig. 1. Matraz Kitasato para la fijación de la muestra en filtro de policarbonato de 0.22 µm de poro



2.2. Identificación por 16S-ARDRA y PCR específica:

Siembra en placas de MRS y MLO con natamicina a 28 °C durante 2-5 días, a partir de las colonias aisladas se realizó una amplificación del gen 16S-rDNA según describe Rodas *et al* [2], los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *Mse*I y los fragmentos visualizados en un gel de agarosa obteniendo un perfil propio de cada especie.

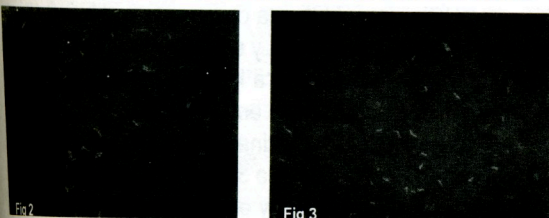
Se procedió a realizar una PCR específica de *O. oeni* como describen Zapparoli *et al.* [3], que amplifica un fragmento de 1025 parejas de bases del gen del enzima maloláctico de esta especie. Los cebadores son On1 (5'-TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT-3') y On2 (5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3'), y la amplificación de PCR es de 30 ciclos (45 segundos a 94°C, 2 minutos a 64°C y 2 minutos a 72°C).

3. RESULTADOS

La única especie presente en este muestreo durante la FML y el envejecimiento de los vinos fue *O. oeni*, y la evolución de la población de esta especie variaba en función de las condiciones aplicadas al vino (Figs. 2 y 3).

Fig. 2. Hibridación *in situ* con la sonda de *O. oeni*.

Fig. 3. Hibridación *in situ* con fluoresceína de bacterias totales.

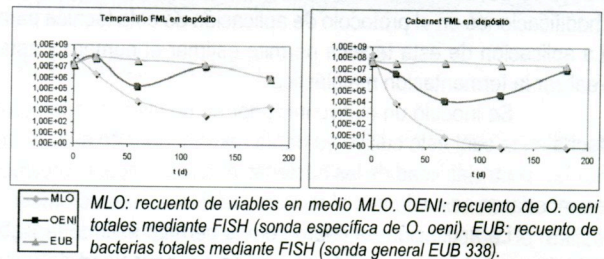


Tras los 20 días de finalización de la FML se observa (Fig. 4) una bajada significativa del número de *O. oeni* detectados mediante recuento en placa y las sondas. A partir de los dos meses de crianza no se detectaron bacterias lácticas viables, que sí se cuantificaron mediante el empleo de las sondas marcadas con fluorocromos. Los recuentos resultaron ser más elevados en FISH, debido al hecho de que esta técnica detecta organismos totales y no sólo las viables como en el caso del recuento en placa.

Se observó una total coincidencia de los resultados de identificación tanto por FISH como por PCR específica y 16S-ARDRA. Ello demuestra la idoneidad de este sistema al compararlo con otros métodos moleculares de probada fiabilidad como son el 16S-ARDRA y la PCR específica.

Este método es mucho más rápido para seguir la evolución de las poblaciones durante la FML al proporcionar resultados cuantitativos en tiempos mucho más cortos, evitando el cultivo de los microorganismos, que son necesarios para la realización de otro tipo de pruebas moleculares.

Fig 4. Estudio de la evolución de la microbiota autóctona en las variedades de Tempranillo y Cabernet-Sauvignon en depósito desde final de la fermentación maloláctica hasta 6 meses de crianza.



4. CONCLUSIONES

Los recuentos obtenidos con ambos tipos de aproximación son comparables, teniendo en cuenta que FISH permite un recuento de totales mientras que el crecimiento en placa permite sólo el de viables.

Se ha observado en los vinos analizados una total correlación en los resultados de identificación observados por la técnica FISH y 16S-ARDRA.

La técnica de FISH se aplica directamente a las muestras de mostos y vinos, y permite cuantificar e identificar de forma rápida y simultánea (unas 3 horas) las distintas poblaciones microbianas a lo largo de la vinificación. De este modo, posee ventajas frente a otras metodologías moleculares, además de ser una tecnología directamente aplicable en bodega para el control de calidad de vinos en fermentación y acabados.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. BLASCO, L.; FERRER, S.; PARDO, I. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225: 115-123.
2. RODAS, A.M.; FERRER, S.; PARDO, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of Lactic Acid Bacteria isolated from grape must ana wine. *Sistematic and Applied Microbiology* 26: 412-422.
3. ZAPPAROLI, G.; TORRIANI S.; PESENTE P.; DELLAGLIO F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 243-246.
4. SELINUMMI, J.; YLI-HARJA, O.; PUHAKKA, J.A. 2005. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *BioTechniques* 39: 859-863.