



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**PROGRAMA DE DOCTORAT D'ENOLOGIA**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA**

**FACULTAT D'ENOLOGIA**

**DESARROLLO DE MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA  
EL ANÁLISIS DIRECTO DE BACTERIAS ACÉTICAS DE VINAGRE**

Memoria presentada por  
**CARLA INGRID JARA CAMPOS**  
para optar al grado de Doctora en Enología  
Tarragona, 2009



Els sotasignats, Dra María Jesús Torija Martínez, Professora Lectora, i Dr. Albert Mas Barón, Catedràtic de Universitat de Nutrició i Bromatologia, ambdós adscrits a la Universitat Rovira i Virgili

FAN CONSTAR

Que el present treball, amb títol “Desarrollo de métodos de Biología Molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de Vinagre” que presenta la Sra. Carla Ingrid Jara Campos per optar al grau de Doctora per la Universitat Rovira i Virgili ha estat realitzat sota la nostra direcció i que tots els resultats són fructe dels experiments duts a terme per l'esmentada doctoranda.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

María Jesús Torija Martínez

Albert Mas Barón



## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada durante estos años, gracias a la beca del proyecto Europeo WINEGAR, la cual me ha dado un apoyo económico, fundamental para terminar este proceso y mis estudios en el extranjero.

Al término de esta investigación hay muchas personas a las que tengo que agradecer durante estos años. En primer lugar a mis directores de tesis Dr. Albert Mas Barón y Dra. María Jesús Torija Martínez, los que han tenido toda su predisposición para orientarme, darme sus consejos y compartir sus conocimientos conmigo, que tan útiles han sido y seguirán siendo en mi vida profesional.

A todos los profesores y personas que trabajan en el Departament de Bioquímica i Biotecnologia, así como de la Facultad de Enología, por ayudarme en todo lo que he necesitado en estos años.

A todos los doctorandos con los que he me relacionado en mayor o menor medida. Gracias por brindarme sus ideas, apoyo, consejos y momentos inolvidables, sin ustedes nada hubiera sido lo mismo. Muchísimas gracias y mucha suerte.

Un agradecimiento especial a todas las personas, profesores que trabajan en el laboratorio de Microbiología Enológica de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA), por brindarme toda su ayuda y comprensión.

Por último, lo más importante, mi familia. Todos. Especialmente a mi Mamá y a Juan Sánchez, por su sacrificio, por aguantarme, por su paciencia y apoyo incondicional. A todos mis amigos de Chile, simplemente por estar apoyándome desde tan lejos.



*A mi Mamá y Tío Juan*





# ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	13
<b>PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL</b>	19
<b>INTRODUCCIÓN</b>	23
1.1 CARÁCTERÍSTICAS GENERALES	25
1.2 METABOLISMO	25
1.2.1 METABOLISMO DEL ETANOL	26
1.2.2 METABOLISMO DE OTROS ALCOHOLES	27
1.2.3 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS	28
1.2.4 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS	29
1.2.5 METOBOLISMO DEL NITRÓGENO	30
1.3 TAXONOMÍA	30
1.4 AISLAMIENTO	33
1.5 CUANTIFICACIÓN	35
1.6 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES	37
1.6.1 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE	38
1.6.2 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE CEPA	42
1.7 ESTUDIOS ECOLÓGICOS	43
1.7.1 EN UVAS Y VINOS	43
1.7.2 VINAGRES	44
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	48
<b>PRIMERA PARTE</b>	61
ESTUDIO ECOLÓGICO DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VIÑEDOS DE CHILE.	

<b>SEGUNDA PARTE:</b>	85
COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS ACÉTICAS PROCEDENTES DE VINOS Y VINAGRES	
<b>TERCERA PARTE:</b>	109
SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS DURANTE UN PROCESO DE ACETIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO	
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	137
<b>CONCLUSIONES</b>	155
<b>ANEXOS</b>	159

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La presente tesis doctoral se ha realizado tanto en los laboratorios del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, en Santiago de Chile, como en los del grupo de investigación en Biotecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili (URV). Inicialmente, mi trabajo fue fruto de un convenio de colaboración entre las dos instituciones para desarrollar el Proyecto “Análisis de poblaciones naturales de bacterias acéticas en Chile”, subvencionado por las ayudas ACI2003 CONICYT (Chile) – DURSI y AECI A/1803/04. Como resultado de dicha colaboración, codirigida por los Dres Jaime Romero (INTA, Chile) y Albert Mas (URV) se presentó la primera parte del presente trabajo como Trabajo de investigación para la obtención del Diploma de estudios Avanzados (DEA) del programa de Doctorado en Enología de la URV. Posteriormente me incorporé plenamente al grupo de investigación de "Biotecnología Enológica" en el año 2005 para llevar a término el resto de mi tesis doctoral, realizada bajo la dirección de los Dres. Albert Mas y María Jesús Torija bajo los auspicios de los proyectos AGL2004-07494-C02-02/ALI (Desarrollo de metodología para la cuantificación, identificación y evaluación de bacterias acéticas para la producción de vinagres de vino financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia) y el Proyecto Europeo WINEGAR (Wood solutions to excessive acetification length in traditional vinegar production).

Ya en el trabajo preliminar como en los proyectos mencionados se planteaba la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de análisis e identificación de las bacterias acéticas y su aplicación al estudio de poblaciones de vinagres, en lo que se centró la tesis doctoral. Consecuentemente, la presente tesis doctoral pretende demostrar la siguiente hipótesis:

Los métodos moleculares independientes de cultivo, al posibilitar un análisis más completo de las poblaciones de bacterias acéticas se pueden convertir en una herramienta fundamental para el control microbiológico de vinos y vinagres.

Para el desarrollo de la tesis se establecieron los siguientes objetivos:

1. Análisis de los métodos moleculares existentes para la identificación de bacterias acéticas y su aplicación a una situación desconocida con el fin de establecer de forma clara sus limitaciones y analizar las posibles soluciones.
2. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos para su aplicación en el análisis de bacterias acéticas en vinos y vinagres

### 3. Validación de estas metodologías en acetificaciones reales mediante el uso de técnicas independientes de cultivo.

La evaluación de las técnicas moleculares existentes se analizó en el primer capítulo de esta tesis. Como aplicación a una situación desconocida se planteó un estudio ecológico de bacterias acéticas en los valles vitícolas de Chile.

#### ¿Por qué realizar este estudio en Chile?

Existen varias razones de peso para hacer este estudio. En primer lugar, Chile es un país que se puede considerar aislado ya que hay barreras geográficas (Cordillera de los Andes y desierto del Norte de Chile) que limitan el intercambio biológico con los países vecinos. En segundo lugar, debido a esta situación geográfica y a la disposición de sus viñedos en valles, lo que hace que sean zonas relativamente aisladas entre sí, podía ser una buena fuente para la identificación de nuevos géneros o especies de bacterias acéticas. Dicho aspecto se ve aumentado por las grandes diferencias climáticas y geográficas existentes entre los diferentes valles, y por tanto, tenía un gran interés observar si las condiciones climáticas interferían en la distribución poblacional de las bacterias acéticas o incluso imponían una selección de especies. En tercer lugar, al ser Chile un país en el que el desarrollo de la industria de producción de vinagre no tiene tradición y se encuentra en la actualidad muy poco desarrollada, la introducción de iniciadores comerciales y la posible contaminación externa es mínima. Y finalmente, porque no había estudios previos de este tipo en Chile, a pesar de la pujanza de su industria vitivinícola.

La evaluación y optimización de los métodos de extracción de DNA de bacterias acéticas conforman el segundo capítulo de esta tesis doctoral y se aplica tanto a vinos como vinagres.

#### ¿Cuáles son los factores que interfieren en la extracción de DNA?

La eficacia de la extracción de DNA se ve afectada por factores como una lisis incompleta de la célula, la absorción del DNA a materiales externos, la presencia de inhibidores enzimáticos o la posible degradación del DNA. Por lo tanto, el método de extracción de



DNA utilizado es de suma importancia para obtener resultados de buena calidad en los análisis posteriores.

En el caso del vinagre, por tratarse de una matriz muy compleja, con presencia de polifenoles, en especial taninos, y polisacáridos que pueden afectar a la calidad del DNA obtenido por extracción directa, se hace muy evidente la necesidad de optimizar los protocolos de extracción.

Y finalmente se realizó el seguimiento de la evolución de las especies de bacterias acéticas durante una acetificación utilizando técnicas independientes de cultivo, lo que constituye el tercer capítulo.

¿Por qué es un problema estudiar las bacterias acéticas?

Las técnicas moleculares proporcionan una herramienta excepcional para la detección, identificación y la caracterización de los microorganismos implicados en ecosistemas ambientales y de alimentos. Desafortunadamente, el estudio de la biodiversidad microbiana todavía está obstaculizado por la dificultad de identificar y de caracterizar los microorganismos sin un aislamiento previo en medios de cultivo.

Durante el cultivo o el uso de medios de enriquecimiento, se puede alterar la estructura de la comunidad con la imposición de nuevas condiciones selectivas. Por tanto, en la mayoría de los casos, no podemos obtener una visión completa de la diversidad microbiana de un ecosistema dado, ya que sólo podemos caracterizar una parte de ella, las cepas cultivables.

Concretamente en el caso de las bacterias acéticas, uno de los grandes problemas para su estudio es su baja recuperación en medios de cultivo cuando las muestras provienen de medios con alto contenido en etanol o ácido acético, como es el caso de vino y el vinagre. Esta limitada recuperación se ha asociado con la entrada de las células en un estado de viable pero no cultivable (VNC) cuando éstas se encuentran en condiciones adversas.

Por tanto, ¿por qué utilizar técnicas independientes de cultivo para el estudio del proceso de acetificación?

Estas técnicas permiten hacer estudios de dinámica poblacional o de biodiversidad sin la necesidad de aislar previamente los microorganismos en un medio de cultivo. Así, la aplicación de técnicas independientes de cultivo ha demostrado la existencia de una diversidad microbiana extensa sin descubrir en la naturaleza y son una buena herramienta para determinar la sucesión de las comunidades bacterianas, proporcionando un enorme

progreso en la ecología microbiana de los alimentos. Por tanto, su aplicación a matrices complejas como el vinagre puede proporcionar mucha información acerca del proceso de acetificación que aún desconocemos.

# PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL



Con el fin de conseguir los objetivos propuestos, se realizó el siguiente desarrollo metodológico:

### Primera Parte: **ESTUDIO ECOLÓGICO DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VIÑEDOS DE CHILE.**

El estudio se realizó en viñedos ubicados en zonas vitícolas de Chile (Anexo I). Se tomaron muestras de uvas de diferentes variedades tintas: Cabernet Sauvignon, Carménère, Pinot Noir, Shiraz, Cabernet Franc.

Para seleccionar las muestras a analizar se utilizaron como criterio de selección, la tinción de Gram y la formación de halo en medio GYC.

Las colonias seleccionadas se identificaron mediante técnicas de Biología Molecular (Anexo II):

1. RFLPs-PCR del gen 16S rRNA
2. RFLPs-PCR de la zona intergénica 16S-23S rRNA (ITS).
3. PCR con primers arbitrarios. (RAPD-PCR)

### Segunda Parte: **COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS ACÉTICAS PROCEDENTES DE VINOS Y VINAGRES.**

Para realizar este estudio se compararon 5 métodos, 3 de ellos comerciales, para la extracción de DNA de bacterias acéticas de muestras de vino y vinagre. Para ello, 4 matrices (vino blanco y tinto y vinagre de tipo superficial y sumergido) fueron contaminadas con 2 cepas de bacterias acéticas: *Acetobacter pasteurianus* (LMG 1262<sup>T</sup>) y *Gluconacetobacter hansenii* (DSMZ 5602<sup>T</sup>).

Las bacterias inoculadas en las 4 matrices se mantuvieron durante 24h a 13h para aumentar el efecto de la matriz sin que hubiera crecimiento. Para mejorar el rendimiento y calidad del DNA, se ensayaron dos pretratamientos (lavados con PVP o NaCl) antes de iniciar la extracción.

La cantidad de DNA extraído se analizó por fluorometría y Real-Time PCR (RT-PCR), mientras que la calidad del DNA se evaluó por amplificación del gen del 16S (PCR del 16S rRNA) en una PCR convencional.

### Tercera parte: **SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS DURANTE UN PROCESO DE ACETIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO**

Para estudiar la evolución de diferentes especies de bacterias acéticas a lo largo de la acetificación, se inoculó un vino con la misma concentración ( $10^6$  cel/ml) de 5 cepas de bacterias acéticas de especies diferentes: *Acetobacter pasteurianus* DSMZ 3509<sup>T</sup>, *Acetobacter aceti* DSMZ 3508<sup>T</sup>, *Gluconacetobacter hansenii* DSMZ 5602<sup>T</sup>, *Gluconobacter oxydans* DSMZ 7145<sup>T</sup>, *Gluconacetobacter europaeus* DSMZ 2004.

Con cada una de estas cepas se preparó una “madre” y cuando alcanzaron la población suficiente se preparó un inóculo mixto y se inició un proceso de acetificación superficial. La acetificación se llevó a cabo en una barrica de roble de 10 litros de capacidad.

El seguimiento de la acetificación se realizó midiendo el aumento de ácido acético y la disminución del etanol a lo largo del proceso. En diferentes puntos de la acetificación se tomaron muestras para analizar la población total y viable mediante el kit LIVE/DEAD Baclight Bacterial Viability.

El estudio de la evolución de las especies a lo largo del proceso se analizó por diferentes técnicas independientes de cultivo (Anexo II):

1. RFLPs-PCR del gen 16S rRNA
2. DGGE-PCR
3. RT-PCR: usando SybrGreen para la detección y cuantificación de las bacterias acéticas totales y sondas TaqMan-MGB para la identificación y cuantificación de cada una de las 5 especies.

# INTRODUCCIÓN





### 1.1 Características generales

Las bacterias acéticas (BA) son microorganismos Gram-negativos o Gram-variables, de forma elipsoidal o cilíndrica. Su tamaño varía entre 0.4 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho y de 0.8 a 4.5  $\mu\text{m}$  de longitud. Son móviles debido a la presencia de flagelos polares o peritricos y poseen un metabolismo aeróbico estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones. Presentan actividad catalasa positiva y oxidasa negativa.

Referente a su desarrollo, su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C y su pH óptimo es de 5-6, aunque crecen bien a pH inferiores a 4 (De Ley et al., 1984). Se suelen encontrar en substratos azucarados y/o con presencia de alcohol como pueden ser zumos de frutas, vino, sidra, cerveza o vinagre.

Las BA tienen un gran interés para la industria biotecnológica, ya que además de la bien conocida producción de vinagre, también se utilizan para la producción industrial de sorbosa y de celulosa.

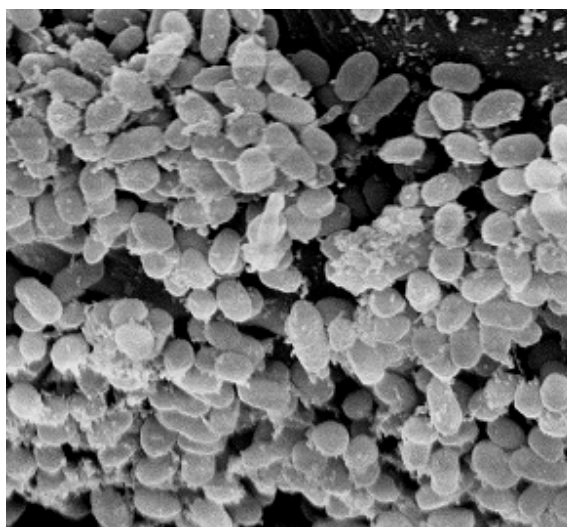


Fig. 1. Imagen de las bacterias acéticas realizada con un microscopio electrónico

### 1.2 Metabolismo

Las BA tienen un metabolismo estrictamente aerobio, por lo que dependen de la disponibilidad de oxígeno molecular. Sin embargo, se ha observado que pueden sobrevivir en condiciones muy cercanas a la anaerobiosis, debido a la posibilidad de utilizar quinonas, como aceptores terminales de electrones, en lugar del oxígeno. De todas maneras, en estas

condiciones, su crecimiento y desarrollo está muy restringido y por tanto, cualquier proceso que involucre una aireación facilita enormemente su desarrollo (Drysdale y Fleet, 1989).

Otro factor importante para su desarrollo es la fuente de carbono. Dependiendo de ésta, las BA utilizan diferentes rutas metabólicas, con intermediarios y productos finales distintos. De forma general, se puede decir que estos microorganismos realizan una oxidación incompleta de azúcares y alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales.

### 1.2.1 Metabolismo del etanol

La oxidación del etanol a ácido acético, es la característica más conocida de estas bacterias. Este proceso bioquímico consta de dos etapas: primero el etanol es transformado en acetaldehído por la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente, el acetaldehído se transforma en ácido acético por la acetaldéhidó deshidrogenasa (ALDH). Ambas enzimas están situadas en la membrana celular, con el centro activo hacia el exterior, por lo que su actividad se presenta principalmente en el espacio periplasmático y no en el interior de la célula (Saeki et al., 1997a). De todas maneras, también se ha detectado otra forma de ADH en el citoplasma, aunque ésta presenta una actividad específica muy inferior, lo que hace que su posible contribución a la oxidación del etanol sea limitada (Adachi et al., 1978, Takemura et al., 1993, Matsushita et al., 1994).

Por su parte, la ADH ligada a la membrana tiene un pH óptimo de 4, aunque puede estar activa a pH inferiores, es independiente de  $\text{NADP}^+$  y utiliza como cofactor la quinona de pirroloquinolina (PQQ). La actividad de esta ADH es más estable en *Acetobacter* que en *Gluconobacter*, lo que puede explicar la mayor producción de ácido acético de las primeras (Matsushita et al., 1994).

La ALDH presenta un pH óptimo alrededor de 4 y 5, aunque al igual que la ADH, es activa a pHs inferiores e independiente de  $\text{NADP}^+$ . Estas enzimas (ADH y ALDH) presentan diferente afinidad por el oxígeno, siendo más sensible la ALDH, lo que implica que si existe limitación de oxígeno disuelto en el medio se produce una acumulación de acetaldehído, que puede llegar a ser tóxico para las propias bacterias. La ALDH también es más sensible a la concentración de etanol que la ADH y por tanto, medios con alto contenido alcohólico, pueden presentar una mayor acumulación de acetaldehído.

Las cepas de *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* pueden oxidar completamente el ácido acético a CO<sub>2</sub> y agua a través del ciclo de Krebs. Pero esto sólo sucede cuando no hay etanol en el medio y se cree que se trata de un cambio irreversible en su metabolismo y que por tanto, una vez lo realizan ya no son capaces de oxidar de nuevo etanol (De Ley et al., 1984, Drysdale y Fleet, 1989, Guinzani y Mothershaw, 2006). Las cepas de *Gluconobacter* no son capaces de llevar a cabo esta oxidación porque tienen un ciclo de Krebs que no es funcional.

Las BA son capaces de producir altas concentraciones de ácido acético, característica que ha sido de gran importancia en la industria de elaboración de vinagre. Existen cepas que son capaces de producir hasta 150 g l<sup>-1</sup> de ácido acético en una acetificación (Sievers et al., 1997; Lu et al., 1999), tratándose de una característica totalmente dependiente de cepa.

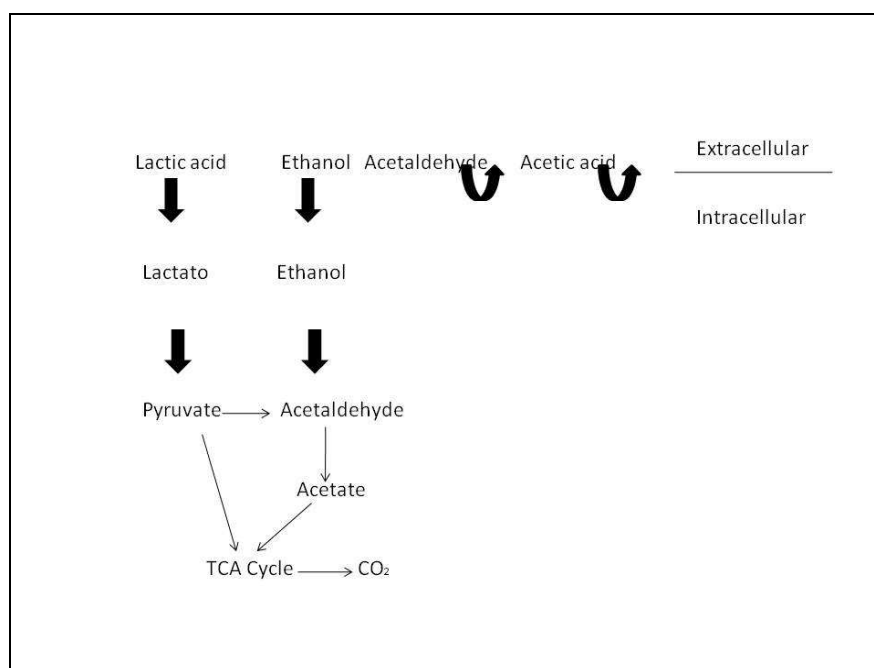


Fig. 2. Metabolismo del etanol en bacterias acéticas.

### 1.2.2 Metabolismo de otros alcoholes

El glicerol es el producto secundario más importante de la fermentación alcohólica y también puede ser fuente de carbono para las BA (De Ley et al., 1984). El glicerol es

mayoritariamente transformado en dihidroxiacetona (cetogénesis), aunque una parte se puede utilizar de forma efectiva para la producción de biomasa.

La capacidad de oxidación de las BA se extiende también a otros alcoholes primarios y polialcoholes, los cuales son transformados a sus respectivas cetonas o cetosas. La localización en la membrana de la mayoría de las enzimas que catalizan estas reacciones produce la acumulación de estos sustratos en el medio (Deppenmeier et al., 2002).

### 1.2.3 Metabolismo de los carbohidratos

Las BA pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, siendo la glucosa la más utilizada. A diferencia de lo que sucede en levaduras, las BA no pueden metabolizar la glucosa por la vía de la glucólisis o Embden-Meyerhof Parnas, ya que aunque la mayoría de las reacciones de la ruta son funcionales, la vía completa no es operativa, debido a la falta de la enzima fosfofructoquinasa. Por lo tanto, las BA deben utilizar otras rutas alternativas para utilizar los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía, tales como:

- El sistema de la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa: En este sistema, un mol de glucosa 6- fosfato es transformado en un mol de ribulosa-5- fosfato con formación de 2 moles de NADPH. La producción de energía es debida a la reoxidación de estos moles de NADPH a través de la cadena respiratoria y a la producción de ATP por la fosforilación oxidativa.
- La vía Enter-Doudoroff: Se trata de una extensión del sistema anterior, en la que a partir de la glucosa 6- fosfato se produce gluconato-6- fosfato, el cual se hidroliza mediante una aldolasa a piruvato y gliceraldehído-3- fosfato. A partir de ambas moléculas se acaba formando acetato por descarboxilación. Esta reacción es característica de algunas cepas de *Gluconobacter oxydans*.
- La vía Warburg-Dickens o ciclo de las hexosas monofosfato: Esta ruta es la más común para metabolizar la glucosa, estando presente en todas las especies de BA. A partir de la ribulosa-5- fosfato formada por el sistema de la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa se producen monosacáridos de distinto tamaño que dan finalmente lugar a triosas- fosfato, las cuales sí que pueden ser metabolizadas por la vía Embden-Meyerhoff Parnas.

La ruta por la cual las BA oxidan la glucosa depende del pH y de la concentración de glucosa (Qazi et al., 1991). Los productos finales de todas las rutas descritas pueden ser

oxidados completamente hasta  $\text{CO}_2$  y agua a través del ciclo de Krebs, excepto en las especies del género *Gluconobacter*, que presentan un ciclo de Krebs no funcional, por lo tanto, son incapaces de oxidar completamente estas moléculas. En cambio, las especies *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y por tanto, ésta sólo se dará cuando se hayan consumido completamente las fuentes de carbono presentes en el medio (Saeki et al., 1997b).

Aunque como acabamos de comentar la glucosa puede ser oxidada completamente, también puede ser parcialmente oxidada a ácido glucónico. Esta reacción es especialmente activa en *G. oxydans*, siendo característica de sustratos ricos en azúcares como la uva o los mostos. En estos casos, la acumulación de ácido glucónico es un marcador típico del crecimiento de BA. De todas maneras, la glucosa no es el único carbohidrato que metabolizan las BA, pudiendo utilizar otros como la fructosa, galactosa, arabinosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol o xilosa (De Ley et al., 1984).

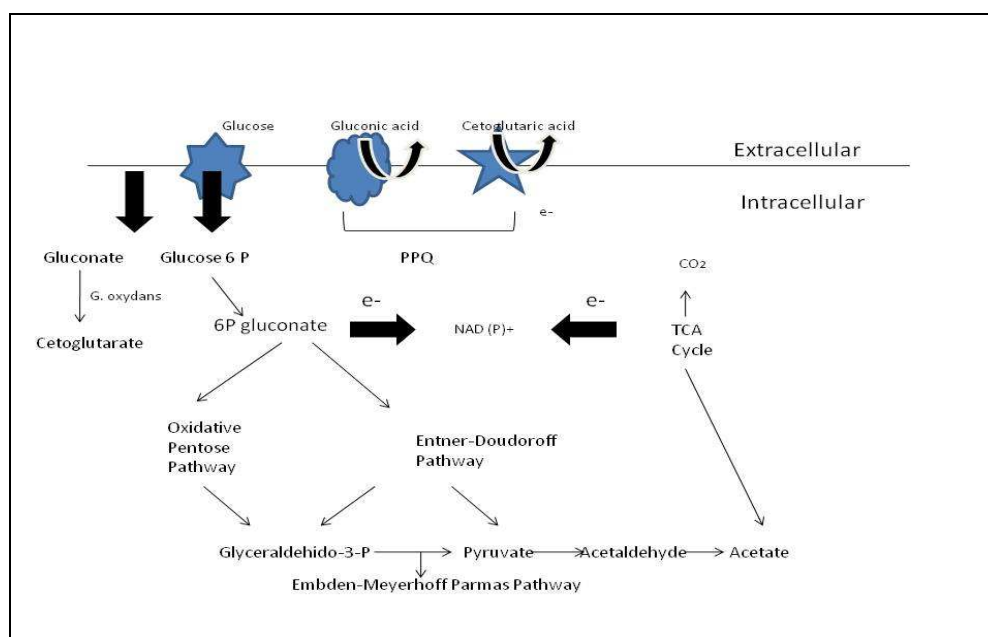


Fig. 3. Metabolismo de Hidratos de Carbono en bacterias acéticas.

#### 1.2.4 Metabolismo de los ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos que presentan un grado de oxidación intermedia y que por tanto, son susceptibles de seguir siendo oxidados por las BA. De forma general,

esta oxidación se realiza a través del ciclo de Krebs, obteniéndose como producto final  $\text{CO}_2$  y agua. En el caso de *Gluconobacter*, la falta de un ciclo de Krebs funcional hace que sean incapaces de metabolizar la mayoría de los ácidos orgánicos (Holt et al., 1994)

Aunque la degradación de los ácidos orgánicos puede ser completa, como acabamos de comentar, también puede darse una oxidación incompleta generando toda una serie de metabolitos intermedios. Este es el caso, por ejemplo del ácido láctico, el cual es una buena fuente de carbono para varias BA, pudiéndolo oxidar por diferentes rutas metabólicas y con distintos productos finales. El ácido láctico puede ser oxidado a piruvato, luego hidrolizado a acetaldehído y  $\text{CO}_2$ , por acción de la enzima piruvato descarboxilasa y posteriormente el acetaldehído oxidado a ácido acético (Raj et al., 2001). Otra alternativa es la ruta de producción de la acetoína, utilizando el acetaldehído como sustrato intermedio.

### 1.2.5 Metabolismo del nitrógeno

Aunque algunas BA como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Gillis et al., 1989), el resto de especies utilizan el amonio como fuente de nitrógeno simple (De Ley et al., 1984), ya que a partir de éste, las BA pueden sintetizar todos los aminoácidos y compuestos nitrogenados. Además, la presencia de aminoácidos en el medio puede tener tanto un efecto estimulador como inhibidor del crecimiento de las BA dependiendo del aminoácido de que se trate. Así el glutamato, glutamina, prolina e histadina estimulan el crecimiento de las BA, mientras que la valina inhibe el de las cepas de *G. oxydans* o la treonina y homoserina el de *A. aceti* (Belly y Claus, 1972).

Aunque no se han realizado estudios sobre los requerimientos nitrogenados de las BA, Valero et al. (2003) observaron que las BA presentan una preferencia selectiva por algunos aminoácidos durante la producción de vinagres.

## 1.3 Taxonomía

La primera nomenclatura del grupo de BA se le atribuye a Peerson en 1822, que las denominó *Mycoderma*. Posteriormente, Pasteur (1868) hizo el primer estudio sistemático de una acetificación, observando que la “madre del vinagre” era una masa de organismos vivos que producían la acetificación y que ésta, sólo se llevaba a cabo en presencia de

*Mycoderma aceti*. En 1879, Hansen observó que la microbiota que convertía el alcohol en ácido acético estaba compuesta por varias especies de bacterias. El género *Acetobacter* fue propuesto por primera vez por Beijerinck (1899).

Tradicionalmente, la taxonomía de las BA se ha ido construyendo a partir de criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Así, en 1925, Visser't Hooft, fue el primero en proponer una clasificación de acuerdo a estos criterios, luego Asai (1935), propuso clasificar las BA en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. En 1950, Frateur, propuso una clasificación basada en los siguientes criterios fisiológicos: catalasa, producción de ácido glucónico a partir de la glucosa, oxidación del ácido acético en CO<sub>2</sub> y agua, oxidación del ácido láctico en CO<sub>2</sub> y agua y oxidación del glicerol en dihidroxiacetona. De acuerdo a estos criterios propuso la subdivisión de *Acetobacter* en cuatro grupos: *peroxydans*, *oxydans*, *mesoxidans* y *suboxidans*. En la octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan y Gibbons, 1974) continuaban apareciendo estos dos géneros, *Acetobacter* (móvil por flagelos peritricos o no móvil) y *Gluconobacter* (móvil por flagelos polares o no móvil), colocando el género *Gluconobacter* dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, mientras que el género *Acetobacter* no se asignaba a ninguna familia. En la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984), se incluyeron entre las claves taxonómicas algunas pruebas moleculares como la composición de ácidos grasos, la electroforesis de proteínas soluble, el % G+C y la hibridación DNA-DNA y con estas técnicas se observó que los 2 géneros, *Acetobacter* y *Gluconobacter* estaban muy relacionados filogenéticamente. De forma que ambos géneros se incluyeron en la familia *Acetobacteraceae* por su capacidad de oxidar el etanol a ácido acético. El género *Acetobacter* constaba de 4 especies: *A. aceti*, *A. liquefaciens*, *A. pasteurianus* y *A. hansenii*, mientras que el género *Gluconobacter* estaba formado por una única especie, *G. oxydans* (De Ley et al., 1984).

La clasificación taxonómica bacteriana ha sufrido grandes cambios en los últimos años. La familia *Acetobacteraceae* no ha sido una excepción, ya que la aplicación de nuevas pruebas, basadas en técnicas de biología molecular, ha permitido la revisión de la clasificación de las BA, tanto por el reordenamiento de géneros y especies ya existentes como por la identificación de nuevos géneros y especies. Así Yamada y Kondo (1984), propusieron un nuevo subgénero llamado *Gluconacetobacter*, el cual fue consolidado como

género por Yamada et al., (1997). En los años siguientes, Yamada et al., (2000) y Lisdiyanti et al., (2002) definieron los géneros *Asaia* y *Kozakia*, respectivamente.

Actualmente, las BA están clasificadas en 10 géneros, todos ellos incluidos en la familia *Acetobacteraceae*: *Acetobacter* (dividido en 2 grupos: *A. aceti* y *A. pasteurianus*), *Gluconobacter* (compuesto por 2 grupos: *G. oxydans* y *G. cerinus*), *Acidomonas*, *Gluconacetobacter* (formado por dos grupos), *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* y *Granulibacter* (Yamada y Yukphan, 2008). Dentro de estos géneros, se han descrito un total de 45 especies (Tabla 1). 6 de estos géneros (*Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* y *Granulibacter*) son monotípicos, es decir, que están compuestos por una única especie. La identificación de cepas pertenecientes a estos géneros en fuentes típicas de aislamiento de BA, como pueden ser vinagres, vino, frutas o flores, suele ser muy poco habitual (Yamashita et al., 2004).



Tabla 1. Cuadro de las especies de bacterias acéticas (Yamada y Yukphan, 2008)

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Glucobacter</i>
<b>Grupo <i>A. aceti</i></b>	<b>Primer grupo</b>	<i>Ac. methanolica</i>	<b>Grupo <i>G. oxydans</i></b>
<i>A. aceti</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>		<i>G. oxydans</i>
<i>A. orleanensis</i>	<i>Ga. diazothopicus</i>		<i>G. albidus</i>
<i>A. estunensis</i>	<i>Ga. sacchari</i>		
<i>A. indonesiensis</i>	<i>Ga. johannae</i>	<b><i>Asaia</i></b>	<b>Grupo <i>G. cerinus</i></b>
<i>A. tropicalis</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>As. bogorensis</i>	<i>G. cerinus</i>
<i>A. cibinongensis</i>		<i>As. siamensis</i>	<i>G. frateurii</i>
<i>A. orientalis</i>	<b>Segundo grupo</b>	<i>As. Krungthepensis</i>	<i>G. thailandicus</i>
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Ga. xylinus</i>		
<i>A. malorum</i>	<i>Ga. hansenii</i>		
<i>A. oeni</i>	<i>Ga. europaeus</i>	<b><i>Kozakia</i></b>	
<i>A. nitrogenifigens</i>	<i>Ga. entanii</i>	<i>K. baliensis</i>	
	<i>Ga. oboediens</i>		
<b>Grupo <i>A. pasteurianus</i></b>	<i>Ga. intermedius</i>	<b><i>Saccharibacter</i></b>	<b><i>Swaminathania</i></b>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. swingsii</i>	<i>Sa. floricola</i>	<i>S. salitolerans</i>
<i>A. pomorum</i>	<i>Ga. rhaeticus</i>		
<i>A. peroxydans</i>	<i>Ga. saccharivorans</i>		
<i>A. syzygii</i>	<i>Ga. nataicola</i>	<b><i>Neosaia</i></b>	<b><i>Granulobacter</i></b>
<i>A. lovaniensis</i>		<i>N. chiangmaiensis</i>	<i>G. bethesdensis</i>

#### 1.4 Aislamiento

Uno de los principales problemas para el estudio de las BA es su cultivo, crecimiento y mantenimiento, especialmente para aquellas cepas que han sido aisladas de fuentes con alto contenido de etanol y de ácido acético como vino y vinagre, respectivamente (Entani et al., 1985; Sievers et al., 1992). Las diferencias fisiológicas existentes entre géneros han llevado a crear medios de cultivos diferenciados para aislar BA dependiendo de cuál sea su origen: mosto de uva, vino o vinagre. Se han descrito numerosos medios de cultivo para el aislamiento de BA, siendo los más utilizados los siguientes:

- Medio GYC (5% D-glucosa, 1% extracto de levadura, 2% CaCO<sub>3</sub>, 2% agar (p/v)), descrito por Carr y Passmore (1979). La presencia del CaCO<sub>3</sub> forma una capa de precipitado blanco en la superficie que da una apariencia opaca al medio de cultivo. La formación de ácido acético por parte de las BA, resulta en la disolución del CaCO<sub>3</sub>, produciéndose un halo transparente alrededor de la colonia. Ruiz et al. (2000) mejoró el medio GYC, suplementándolo con pimáricina (100mg/l) para inhibir el desarrollo de levaduras y hongos, penicilina (3U/ml) para inhibir las bacterias lácticas y ajustando su pH a 4.5.
- Medio Manitol (2,5% manitol; 0,5% extracto de levadura; 0,3% peptona, 2% agar), En su forma líquida es especialmente útil para la producción de biomasa por ser el que produce un mejor crecimiento de BA. Se trata de un buen medio para el aislamiento de BA procedentes de muestras vínicas (Bartowsky et al 2003; Du Toit y Lambrechts, 2000) y de hecho, la recuperación de BA procedentes de este tipo de muestras en este medio es muy similar a la obtenida en el medio GYC.

En estos medios no se han detectado problemas de aislamiento y cultivabilidad de BA procedentes de muestras enológicas, pero en cambio se han observado problemas para la recuperación de bacterias provenientes de muestras de vinagre (Sokollek et al., 1998). Esto se ha resuelto parcialmente con la adición de una doble capa de agar en el medio (0,5% en el fondo y 1% en la superficie) y con la utilización de medios de cultivo que incluyen en su composición etanol y ácido acético, simulando así el hábitat de las BA en el proceso de acetificación, como puede ser el medio AE (ácido acético-etanol) o el medio RAE (ácido acético-etanol reforzado). Estos medios permiten cultivar las BA que pueden llegar a generar concentraciones de ácido acético hasta del 10 al 15% (Entani et al., 1985, Sokollek y Hammes, 1997, Sokollek et al, 1998a).

En nuestro grupo, últimamente se han realizado pruebas con diversos medios de cultivo para mejorar la cultivabilidad y aislamiento de estas bacterias, y se ha propuesto un nuevo medio, el V50. Este medio tiene una composición más compleja, simulando mejor el medio que se encuentran las BA al inicio de la acetificación (Quintero et al., 2008).

Tabla 2. Diferentes medios de cultivo para bacterias acéticas.

Componentes	GYC	YPM	AE	EM	RAE	V50
<b>Extracto de</b>						
<b>levadura</b>	1%	0,50%	0,30%	1%	0,10%	0,40%
<b>Peptona</b>		0,30%	0,40%		0,10%	
<b>Glucosa</b>	5%		0,75%		0,40%	
<b>Manitol</b>		2,50%				
<b>Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	2%			2%		
<b>Ácido acético</b>			3%			
<b>Etanol</b>			3%	2%	0-4%	6%
<b>Glicerol</b>						0,20%
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>						0,05%
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>						0,05%
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>						0,02%
<b>Na acetato</b>						0,10%
<b>CaCl<sub>2</sub></b>						0,01%
<b>Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub></b>					0,03%	
<b>Ácido cítrico</b>					0,015%	

**GYC**, Medio Glucosa; **YPM**, Medio Manitol; **AE**, Medio Ácido acético-Etanol; **EM**, Medio Etanol; **RAE**, medio enriquecido con ácido acético y etanol; **V50**, medio vino sintético.

### 1.5 Cuantificación

La enumeración de las BA es importante desde un punto de vista industrial. Tradicionalmente, las BA se han cuantificado contando las colonias que crecían en las placas de medios de cultivo selectivos, tal y como se ha comentado en el apartado anterior. El problema que presenta el uso de medios de cultivo es que la recuperación de microorganismos es limitada (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998a; Trcek, 2005), aceptándose el hecho de que el cultivo en placa revela sólo una pequeña porción de la verdadera población microbiana presente en los ecosistemas naturales. De hecho, se cree que en los estudios ecológicos se aísla solamente entre el 1-5% de todos los microorganismos presentes (Hunter-Cevera, 1998). Las razones para esta baja recuperación

son por un lado, la falta de detección de microorganismos nuevos, que probablemente no se cultivan bien en los medios de cultivo existentes y por otro lado, la incapacidad de recuperar aquellos microorganismos conocidos que entran en un estado de viable pero no cultivable (VNC). Este estado de VNC se induce cuando la célula se encuentra en condiciones adversas como puede ser falta de nutrientes, baja temperatura u otros tipos de estrés que hacen que células cultivables entren en una fase en la que aunque son activas metabólicamente no son capaces de producir colonias en un medio donde normalmente lo harían (Giraffa y Neviani, 2001). Este estado VNC se ha observado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas en ambientes naturales (Fleet, 1999).

En el caso de las BA, se ha comprobado un gran descenso en su cultivabilidad, sobretodo cuando son muestras con un alto contenido de etanol y sobretodo de ácido acético, como pueden ser el caso de muestras de vino y vinagre (Sokollek et al., 1998a; Millet y Lonvaud-Funel, 2000; Arnold et al., 2002; Mesa et al., 2003). Esta pérdida de cultivabilidad se ha asociado con un estado de VNC de las BA junto con la falta de un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de todas las especies. Todo esto hace que estas BA se consideren microorganismos fastidiosos. De hecho para corroborar estas diferencias, se han realizado diferentes estudios en los que se observado que los recuentos en placa convencionales son considerablemente más bajos que los recuentos al microscopio de fluorescencia (Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006; Torija et al., 2009). Por tanto, ante la imposibilidad de cuantificar correctamente las BA mediante métodos que sean dependientes de cultivo, se han desarrollado sistemas que son independientes de cultivo. Algunos de estos métodos independientes de cultivo ya han sido aplicados a la cuantificación de BA como son la técnica de contaje directo por epifluorescencia (DEFT, Direct Epifluorescent filter technique), la PCR a tiempo real (RT-PCR) y el FISH (Fluorescent in situ hybridization). Las dos últimas las explicaremos más extensamente en el apartado 1.6 de esta introducción.

La cuantificación por epifluorescencia estima más exactamente el número total y viable de células siendo, por tanto, una muy buena alternativa al recuento en placa. Métodos similares se han aplicado con éxito en el tratamiento de aguas (Boulos et al., 1999; Hoefel et al., 2003) y en la tecnología alimentaria (Couto y Hogg, 1999; Hermida et al., 2000). En el caso de BA, fueron Mesa et al. (2003), los que aplicaron la epifluorescencia para

recuentos de BA viables y totales en la producción de vinagre por sistemas sumergidos. Esta técnica permite cuantificar de forma simultánea las células vivas y muertas, basándose en la diferente permeabilidad de la membrana plasmática dependiendo del estado fisiológico de la célula. En este sistema se utiliza el LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability kit (Molecular Probes) que usa dos fluorocromos, el SYTO 9 que tiñe los ácidos nucleicos de color verde y el yoduro de propidio que los tiñe de color rojo. Estos dos fluorocromos se diferencian entre sí por sus características espectrales y por su habilidad para penetrar en las células sanas. El SYTO 9 entra en todas las células y por tanto, tiñe tanto las que tienen una membrana intacta como las que la tienen dañada. En cambio, el yoduro de propidio sólo penetra en aquellas células que tienen su membrana dañada, modificando la intensidad fluorescente del SYTO 9. Por tanto, usando una mezcla adecuada de ambos fluorocromos, aquellas bacterias que tengan su membrana intacta se teñirán de verde y las consideraremos viables y aquellas que tengan su membrana dañada, se teñirán de rojo y las consideraremos no viables. Esta técnica fue mejorada por Baena-Ruano et al. (2006) al realizar estos contajes de BA durante una acetificación, pero usando una cámara de Neubauer especial, con recubrimiento de rodio, el cual posibilita la visualización de las líneas de la cámara al microscopio de fluorescencia y por tanto, permite contar de una forma más rápida y fiable.

## **1.6 Identificación por técnicas moleculares**

Tradicionalmente, las especies bacterianas se identificaban de acuerdo a criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (De Ley et al., 1984). Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular, estas pruebas han quedado prácticamente en desuso y actualmente los criterios utilizados para la clasificación e identificación bacteriana son genotípicos o moleculares. Algunas técnicas moleculares, como la hibridación DNA-DNA o la secuenciación de genes ribosomales, son muy útiles para la realización de estudios taxonómicos, pero al ser técnicas largas, tediosas y caras no se utilizan para la realización de análisis rutinarios como puede ser los estudios ecológicos por el gran número de muestras a procesar.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares rápidas basadas mayoritariamente en la PCR para llevar a cabo este tipo de estudios rutinarios. Es

importante destacar que estas técnicas dan como resultado agrupamientos de microorganismos que no son concluyentes a nivel taxonómico y que, por tanto, el uso de estas técnicas requiere de la comprobación de algunos miembros representativos de cada uno de estos agrupamientos mediante técnicas con valor taxonómico, como son la hibridación DNA-DNA o la secuenciación de genes ribosomales.

Estas técnicas moleculares pueden clasificarse en dos grupos dependiendo del grado de polimorfismo obtenido: las que discriminan a nivel de especie y las que discriminan a nivel de cepa.

### **1.6.1 Identificación a nivel de especie**

RFLPs-PCR del gen 16S rRNA. Es una técnica usada para identificar BA y diferenciarlas agrupándolas en base a sus relaciones filogenéticas (Poblet et al., 2000; Ruiz et al., 2000). La técnica consiste en amplificar el gen ribosomal 16S y después digerir el fragmento amplificado con diversas enzimas de restricción. La combinación de diferentes enzimas permite la identificación de prácticamente todas las especies de BA (González et al., 2006a, Torija et al., 2009). Se trata de un método rápido, fiable y en el que se invierte poco tiempo para la identificación de BA a nivel de género y especie. Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar BA tanto en vino como en vinagre (Poblet et al., 2000, Ruiz et al., 2000, Giudici et al., 2003, González et al. 2004, 2005, 2006a, Ilabaca et al., 2008).

RFLPs-PCR del espaciador intergénico 16S-23S rRNA (ITS). Esta técnica consiste en amplificar la región intergénica (ITS) comprendida entre los genes ribosomales 16S y 23S y luego digerir los amplificados con diversas endonucleasas de restricción. Aunque las secuencias intergénicas se caracterizan por presentar alta variabilidad y permitir distinguir a nivel de cepa (Navarro et al., 1992), en los estudios realizados con BA (Ruiz et al., 2000; Trcek y Teuber, 2002; González et al., 2006a) la discriminación se ha limitado a nivel de especie.

RFLPs-PCR del 16S-23S-5S rRNA. Esta técnica consiste en amplificar los genes ribosomales 16S, 23S y 5S junto con las zonas intergénicas correspondientes, generando un producto de amplificado de unos 4500 pb, para posteriormente digerirlo con el enzima *RsaI*. Los resultados obtenidos son similares a los de las dos técnicas anteriores,

presentando un alto polimorfismo entre especies. La principal desventaja de esta metodología es el tamaño del amplificado.

Esta técnica ha sido utilizada por Gullo et al. (2006) para estudiar las BA durante la producción de vinagre balsámico tradicional.

Análisis del gen que codifica la subunidad I de la ADH dependiente de PQQ. Esta técnica se basa en que la secuencia parcial de *adhA* (subunidad I de PQQ-ADH) presenta tanto zonas conservadas como variables entre las diferentes especies de BA que permite tanto el diseño de oligonucleótidos generales para BA como específicos para especie. Concretamente, Trcek (2005) ha utilizado esta técnica para detectar BA de forma general y *Acetobacter aceti* de forma específica en vinagres de sidra. En este mismo trabajo, se sugiere que esta zona es más discriminante a nivel de especie que el gen 16S rRNA pero menos que la región intergénica 16S-23S rRNA.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Técnica que consiste en la amplificación de una región del genoma y su posterior separación mediante electroforesis desnaturalizante. Normalmente se amplifican los genes ribosomales 16S y 23S porque aunque son regiones muy conservadas presentan pequeñas variaciones que permiten la identificación a nivel de especie. Los amplicones resultantes, con tamaños idénticos entre especies, son separados en geles de poliacrilamida con concentraciones crecientes de los agentes desnaturalizantes (urea y formamida). Esta separación se basa en el distinto comportamiento frente a la desnaturalización y por tanto, diferente migración de los fragmentos que presenten diferencias en su secuencia de DNA. Como la separación es en base a la secuencia y no al tamaño, para la identificación de los géneros/especies se construyen marcadores con los diferentes microorganismos que queremos detectar. Aunque estos marcadores sólo nos permiten hacer una identificación provisional que ha de ser confirmada mediante secuenciación.

Se utiliza principalmente para hacer estudios de biodiversidad, ya que no requiere el aislamiento de los microorganismos, siendo el número de bandas un indicativo del número de especies presentes en la muestra. Esta técnica ha sido utilizada por López et al. (2003) y Andorra et al., (2008) para caracterizar todos los microorganismos del vino (levaduras, bacterias lácticas y BA), por Haruta et al. (2006) para analizar a la población de levaduras y bacterias en la producción del vinagre del arroz y por De Vero et al. (2006) y Ilabaca et al.

(2008) para estudiar a la población de BA en la producción de vinagre y de vinagre balsámico tradicional, respectivamente.

Una de las limitaciones principales de esta técnica es que sólo los microorganismos más importantes presentes en las muestras suelen ser identificados.

PCR en tiempo real (RT-PCR). Técnica que detecta en tiempo real la amplificación del fragmento de interés, es decir, se basa en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. De hecho, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, midiendo la cantidad de DNA sintetizado en cada ciclo, ya que la emisión de fluorescencia producida durante la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR. Esta técnica permite identificar y cuantificar especies bacterianas sin necesidad de cultivarlas. En el caso de la cuantificación es necesario construir una curva patrón, para lo cual se añaden controles externos de concentraciones conocidas y crecientes de DNA diana (o células).

Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser de dos tipos:

- agentes intercalantes: son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice, siendo el más empleado el SybrGreen. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta tanto al producto de PCR esperado, como a posibles productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes durante la PCR.
- sondas de hibridación específicas: son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET. En este estudio se ha trabajado con las primeras.

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las



moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida en su cadena complementaria, y la Taq polimerasa, durante su acción de síntesis, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor, están ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector de la RT-PCR.

Dentro de las sondas TaqMan para aumentar aún más la especificidad de la reacción, nos encontramos con las sondas TaqMan-MGB (minor groove binding: enlazante al surco menor). Estas sondas son muy similares a las sondas TaqMan tanto en el diseño como en la función, pero como se conjugan con el grupo MGB que incrementa la estabilidad de la unión y por tanto, aumenta la temperatura de hibridación ( $T_m$ ), mejoran la especificidad de la unión. Este aumento de la  $T_m$  permite además el diseño de sondas más cortas.

En este trabajo se han empleado ambos sistemas de detección: SybrGreen (Cap 2 y 3) y sondas Taqman (Cap 3).

Las ventajas de esta técnica son que es un método rápido, altamente sensible y específico, que detecta el producto en cada ciclo de la reacción, permitiendo un análisis de la cinética de la reacción, que no hay manipulación post-PCR, evitando el riesgo de contaminación y que permite una cuantificación precisa del DNA. Además de, cómo ya hemos comentado, la posibilidad de cuantificar sin aislamiento previo, por lo que es muy útil para la detección y cuantificación de microorganismos de difícil cultivabilidad, es decir, que pueden presentar el estado de VNC.

González et al. (2006b) y Andorrà et al. (2008) utilizaron la RT-PCR para enumerar las poblaciones totales de BA en vinos y vinagres, mientras que Gammon et al. (2006) diseñaron sondas TaqMan para detectar mediante RT-PCR las especies de *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* en bebidas isotónicas. Finalmente, Torija et al. (2009) han diseñado sondas TaqMan-MGB para la detección y cuantificación mediante RT-PCR de 5 especies de BA: *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter europaeus* y *Gluconobacter oxydans*.

Fluorescence in situ hybridization (FISH): Técnica que consiste en el diseño y utilización de sondas de DNA marcadas con fluorescencia que hibridan de forma específica con un género o especie determinado. Por tanto, permite la identificación y cuantificación rápida y directa de microorganismos mediante microscopía sin necesidad de un cultivo o aislamiento previo. Esta técnica se ha utilizado para detectar diferentes especies de *Gluconacetobacter*, *Ga. sacchari* (Franke et al. 1999) y *Ga. liquefaciens* and *Ga. diazotrophicus* (Franke-Whittle et al., 2005) y otros microorganismos relacionados con el vino como bacterias lácticas (Blasco et al. 2003). La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de detectar y cuantificar microorganismos de difícil cultivabilidad (VNC), mientras su principal inconveniente es que hay compuestos, como polifenoles, polisacáridos, etc presentes en el vino o vinagre que pueden interferir o emmascarar la fluorescencia y limitar la resolución de la técnica.

### **1.6.2 A nivel de cepa**

Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR). Esta técnica consiste en realizar una PCR con un único cebador que es más corto de lo normal (10 nucleótidos) y de secuencia arbitraria. Las condiciones de hibridación son muy poco restrictivas (37°C), de forma que el cebador hibrida en puntos al azar de todo el genoma. Como resultado se producen un gran número de bandas muy polimórficas y que permiten distinguir a nivel de cepa. Es una técnica sencilla y no requiere información previa de la secuencia para el diseño de los cebadores. El principal problema que presenta la RAPD-PCR es su baja reproducibilidad, la cual es inherente a la técnica, y que es la causa de la aparición de algunas bandas poco reproducibles. Esta técnica es útil para realizar estudios de diversidad genética y para tener una estimación de la relación genética entre diferentes cepas. Fue utilizada por primera vez en BA por Trcek et al., (1997) y luego por Nanda et al., (2001) para caracterizar BA en vinagre de arroz. Posteriormente, Bartowsky et al., (2003) usó esta técnica para la diferenciación de cepas de BA en un vino deteriorado.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) y Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR). Los elementos ERIC y REP se definen como secuencias consenso derivadas de regiones repetidas altamente conservadas que se encontraron en bacterias entéricas (Pooler et al, 1996). Sin embargo, parece que estas

secuencias pueden encontrarse en los genomas de la mayoría de los grupos bacterianos. Y por tanto, esta técnica se basa en amplificar las secuencias que se encuentran entre dichas zonas repetidas mediante cebadores que hibridan sobre estos elementos. La utilización de estos oligonucleótidos produce un alto grado de polimorfismo que permite obtener patrones únicos a nivel de cepa.

Dichas técnicas han sido utilizadas para la tipificación de BA tanto de vino (González et al., 2005) como en vinagre (Nanda et al., 2001).

(GTG)<sub>5</sub>-PCR. Es una técnica similar a las anteriores, ya que también se basa en realizar una amplificación entre secuencias repetitivas distribuidas a lo largo del genoma, utilizando, en este caso, el primer (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic et al., 1994; Gevers et al., 2001). De Vuyst et al. (2007) fueron los primeros en aplicar esta técnica en BA, y la han aplicado para la tipificación de cepas de BA en cacao (Camu et al., 2007; 2008).

## **1.7 Estudios Ecológicos**

### **1.7.1 En uvas y vinos**

Las BA se pueden aislar de uva, mosto y vino y su multiplicación va a depender de cómo se realice el proceso de vinificación y de qué tratamientos se lleven a cabo durante el mismo.

La cantidad de BA en el mosto está directamente relacionada con el estado fitosanitario de la uva. Así, en uvas sanas, las BA no suelen superar niveles de  $10^3$  ufc/ml, siendo la especie predominante *G. oxydans*. También se han detectado cepas de la especie *Acetobacter*, aunque en menor proporción (Joyeux et al., 1984, Du Toit y Lambrechts, 2002; González et al., 2004, 2005; Renouf et al., 2005). En cambio, las uvas dañadas, por ejemplo por *Botrytis cinerea*, presentan niveles muy superiores de BA (alrededor de  $10^6$  ufc/ml), detectándose mayoritariamente especies del género *Acetobacter* (*A. aceti* y *A. pasteurianus*). Este aumento de la población de BA se debe a que los azúcares liberados son metabolizados por la levadura produciéndose etanol, que es la fuente de carbono preferida por la especie de *Acetobacter*. De hecho, se ha visto que la especie *G. oxydans* presenta intolerancia a altas concentraciones de etanol, de manera que la producción de este compuesto en uvas dañadas o diferentes estados de podredumbre podría justificar la sustitución de esta especie por las *Acetobacter*, mucho más resistentes al etanol.

Durante el procesado de la uva, el contacto con el material de bodega (prensas, bombas, etc), puede contaminar el mosto con BA, las que se denominan cepas residentes de bodega, que pertenecen principalmente al género *Acetobacter*.

En cuanto a la evolución de las poblaciones de BA durante la fermentación alcohólica, *G. oxydans*, que era, como acabamos de comentar, la especie dominante en el mosto, lo continua siendo en las primeras etapas de la fermentación, debido al alto contenido de azúcares presentes en el medio, pero no suele aislarse en vinos. En cambio, *A. aceti* es la especie mayoritaria en las etapas finales de la fermentación (Joyeux et al., 1984, Drysdale y Fleet, 1988, González et al., 2005). De todas maneras, otras especies también han sido aisladas a lo largo del proceso, como *A. pasteurianus*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Acetobacter oeni* (Joyeux et al., 1984, Du Toit y Lambrechts, 2002, González et al., 2004, Silva et al., 2006). De hecho, la evolución de las especies de BA durante la fermentación alcohólica depende de diversos factores enológicos como la presencia de SO<sub>2</sub>, pH, etanol, temperatura, inoculación de levaduras, etc. Estos factores aunque, en general, inhiben el crecimiento y desarrollo de las BA, también pueden modificar la distribución de especies y cepas de BA a lo largo del proceso.

El crecimiento de BA durante la fermentación alcohólica también depende del número inicial de levaduras y bacterias. Así, se ha visto que la población inicial de BA, antes de que se inicie la fermentación alcohólica, puede determinar el número de células que resisten el proceso, mientras que un crecimiento significativo durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, puede conducir a una fermentación alcohólica incompleta, debido a una interacción entre las levaduras y BA, la cual no está suficientemente comprendida (Drysdale y Fleet, 1989).

### 1.7.2 Vinagres

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad más remota como condimento y conservador de alimentos, siendo un producto habitual en la mayoría de los países mediterráneos. La Reglamentación Técnico-Sanitaria de Vinagres (Ministerio de la Presidencia, 1993) señala que el vinagre debe obtenerse por doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario que contengan azúcares o sustancias amiláceas con una riqueza mínima de 5 grados, excepto para el vinagre de vino que será de

al menos 6 grados. Por tanto, el vinagre se produce en dos etapas, siendo la primera la conversión de los azúcares fermentables en etanol, principalmente realizado por especies de *Saccharomyces* y una segunda etapa donde se produce la oxidación del etanol a ácido acético por parte de las BA.

Desde un punto de vista tecnológico, hay dos sistemas bien diferenciados para producir vinagre:

- método tradicional o método de Orleáns: En este método, también denominado sistema superficial, las BA se encuentran situadas en la interfase líquido/gas en contacto directo con el aire (oxígeno). La presencia de las BA se limita a la superficie del líquido a acetificar y por tanto, se trata de un procedimiento estático. Esto hace que el proceso de acetificación sea lento y que se necesiten períodos de tiempo largos para obtener un grado acético alto. Como contrapartida, el vinagre obtenido por este método es de mayor calidad organoléptica y presenta un bouquet característico, debido a que esta lentitud de la acetificación favorece que se produzca de forma simultánea el envejecimiento (Llaguno y Polo, 1991). Estos productos se suelen elaborar en barricas de madera.
- Métodos rápidos: Dentro de éstos destacan:
  - Método Schützenbach: En este sistema para aumentar la velocidad de producción de vinagre, se aumenta la superficie de contacto de las BA utilizando virutas como soporte. En este método el líquido a acetificar es bombeado a través de un lecho de virutas de madera, donde se encuentran las BA, recirculándolo hasta obtener el grado acético deseado.
  - Cultivo sumergido: En este sistema, como su nombre indica, las BA están sumergidas en la solución a acetificar, no se utiliza material poroso o de soporte, sino que se hacen circular pequeñas burbujas de aire a través de la biomasa bacteriana, inyectándose aire solo o mezclado con oxígeno, favoreciendo la acetificación. La mayor población bacteriana obtenida, así como la disponibilidad constante de oxígeno, permiten obtener rendimientos de transformación de etanol a ácido acético muy elevados, una velocidad de acetificación mayor (23-24 horas) y uniformidad en el producto. Este método requiere una estricta vigilancia de la temperatura, presión parcial de

oxígeno y de los ciclos de carga y descarga, ya que una disminución de la tasa de oxígeno en los acetificadores disminuye dramáticamente la actividad de la población celular. La obtención de vinagres por este sistema, es decir, en cortos períodos de tiempo, requiere de una fuerte aireación y agitación lo que repercute negativamente en la composición volátil del vinagre resultante y por tanto, en su calidad final (Tesfaye et al., 2002).

Aunque desde la antigüedad se ha tenido interés en conocer cuáles son los microorganismos implicados en la producción del vinagre, actualmente todavía no se tiene claro cuales son las especies y cepas responsables de este proceso. De hecho, uno de los principales obstáculos para estos estudios es que estos microorganismos son difíciles de aislar y caracterizar, como ya hemos comentado en los apartados 1.4 y 1.5 de esta introducción. A esto hay que unir los constantes cambios y reordenaciones taxonómicas que ha sufrido el grupo *Acetobacteraceae* en los últimos años (ver apartado 1.3 de esta introducción) y que ha hecho difícil tener una idea clara de cuáles son los microorganismos involucrados en este proceso. Estudios preliminares asociaron el género *Acetobacter* (Asai 1968), especialmente *A. aceti*, *A. pasteurianus*, en la producción del vinagre (De Ley et al. 1984). Aunque estas especies se siguen detectando en los vinagres, también se han aislado nuevas especies.

En los últimos años se han realizado diferentes trabajos poblacionales y ecológicos sobre BA en vino (Du Toit and Lambrechts, 2002; Bartowsky et al., 2003; González et al., 2004; 2005), así como, en vinagres industriales (Sokollek et al., 1998b; Schüller et al., 2000), y otros tipos de vinagre: vinagre de caqui (Kim et al., 2005) o vinagre de arroz (Nanda et al., 2001, Haruta et al., 2006), pero pocos estudios se han centrado en los vinagres de vino producidos por el método tradicional (Gullo et al., 2006, Vegas, 2007, Ilabaca et al., 2008). Como resumen de lo que se conoce hasta ahora, podemos decir que en los sistemas sumergidos, aunque la especie *Gluconoacetobacter europaeus* se ha propuesto como la especie característica de este tipo de vinagres (Sievers et al. 1992, Sokollek et al. 1998b, Trecek et al., 2005), en algunos estudios se han aislado otras especies como *Ga. entanii* (Schuller et al., 2000), *A. pomorum* y *Ga. oboediens* (Sokollek et al., 1998b) como especies mayoritarias.

Por su parte, en sistema tradicional, Giudici et al. (2003) identificaron *Ga. xylinus*, como la principal especie responsable de la producción de aceto balsámico, aunque también se detectaron cepas de otras especies (*A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. malorum*) (Gullo et al. 2006, De Vero et al. 2006).

En recientes estudios, enmarcados en el Proyecto europeo WINEGAR (Wood solutions to a excessive acetification length in traditional vinegar production), que han sido realizados en vinagres obtenidos por el método tradicional en vinagreras de distinta ubicación geográfica, se ha identificado a *A. pasteurianus* y *Ga. europaeus* como las especies responsables de la acetificación. Estos resultados desmienten la idea generalizada, tal y como acabamos de comentar, que asocia a la especie *Ga. europaeus* únicamente con vinagres realizados por sistemas sumergidos (Vegas, 2007).

Hay que remarcar que en estos trabajos sólo se han caracterizado las cepas cultivables de BA y por eso el interés en este trabajo de desarrollar las herramientas necesarias para la aplicación de técnicas independientes de cultivo a estos microorganismos.

## BIBLIOGRAFÍA

Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., and Ameyama, M., 1978. Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 2331-2340.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., and Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25, 849-856.

Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., and Enenkel, A., 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology* 97, 133-145.

Asai, T., 1968. *Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities*. University of Tokio Press. Tokio.

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., and García-García, I., 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* 41, 1160-1164.

Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., and Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307-314.

Blasco, L., Ferrer, S., and Pardo, I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225, 115-123.

Belly, R.T., and Claus, G.W., 1972. Effect of amino acids on the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Archives Microbiology* 83, 237-245.



Boulos, L., Prévots, M., Barbeau, B., Coallier, J., and Desjardins, R., 1999. LIVE/DEAD BacLight™: application of new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiology Methods* 37, 77–86.

Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., and De Vuyst, L., 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1809-1824.

Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K., and De Vuyst, L., 2008. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 86-98.

Carr, J.G., and Passmore, S.M., 1979. Methods for identifying acetic acid bacteria, p. 333-47. In F.A. Skinner & D.W. Lovelock (Ed). *Identification methods for microbiologists*. Academic Press, London.

Couto, J. and Hogg, T., 1999. Evaluation of a commercial fluorochromic system for the rapid detection and estimation of wine lactic acid bacteria by DEFT. *Letters in Applied Microbiology*. 28, 23–26.

De Ley, J., Gosselé, F., and Swings, J., 1984. Genus *Acetobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Williams & Wilkens, Maryland, U.S.A., pp. 268-274.

Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., and Prust, C., 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 233-242.

De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., and Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.

De Vuyst, L., and Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 120-127.

Drysdale, G.S., and Fleet, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal Enology and Viticulture* 39, 143-154.

Drysdale, G.S., and Fleet, G.H., 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 471-481

Du Toit, W.J., and Lambrechts, M. G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., and Suzuki, K. I., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.

Fleet, G. H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101-117.

Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stakebrandt, E., and Sly, L., 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1681-1693.

Franke-Whittle, I.H., O'Shea, M.G., Leonard, G.J., and Sly, L., 2005. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbiology Ecology* 50, 128-139.

Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., and Middleton, A.M., 2006. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in a electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology* 44, 262-267.

Gevers, D., Huys, G., and Swings, J., 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J., and De Ley, J., 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 361-364.

Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19-34.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.

González, A., Hierro, N., Guillamón, J.M., Mas, A., and Poblet, M., 2005. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested-PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., and Poblet, M., 2006a. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108, 141-146.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2006b. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., and Giudici, P., 2006. Characterisation of acetic acid bacteria in “traditional balsamic Vinegar. *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.

Giudici, P., Gullo, M., Pulvirenti, A., Solieri, L., and De Vero, L., 2003. Microflora y la tecnología de producción del vinagre balsámico tradicional. In: Mas A, Guillamón JM (ed) *Primeras jornadas en I+D+I en la elaboración de vinagre de vino (First Symposium on R+D+I for vinegar Production)*. Tarragona, pp 59-69.

Guinzani, N., and Mothershaw, A., 2006. Fermentation: general principles. In: *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, 63761-28. Hui, Y.H., eds. Taylor & Francis, London.

Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., and Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-89.

Hermida, M., Taboada, M., Menéndez, S., and Rodríguez-Otero, J.L., 2000. Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *Journal of AOAC International* 83, 1345–1348.

Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S., and Saint C.P., 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods* 55, 585–97.

Holt, J.M., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.Y., and Williams, S.T., 1994. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> edn, Williams & Wilkens, Maryland, U.S.A. pp, 71-84.

Hunter-Cevera, J.C., 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* 1: 278-285.

Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., and Mas A., 2008. Application of culture independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegar-making process. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of Acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156.

Kim, J.N., Choo, J.S., Wee, Y.J., Yun, J.S., and Ryu, H.W., 2005. Culture medium optimization for acetic acid production by a persimmon vinegar-derived bacterium. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121-124, 861-869.

Llaguno, C., and Polo, M.C., 1991. *El vinagre de vino*. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. Spain.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., and Komagata, K., 2002. *Kozakia baliensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 813-818.

López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., and Mills, D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.

Lu, S.F., Lee, F.L., and Chen, H.K., 1999. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter sp.* *Journal of Applied Microbiology* 86, 55-62.

Matsushita, K., Toyama, H., and Adachi, O., 1994. Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 36, 247-301.

Mesa, M.M., Macías, M., Cantero, D., and Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *The Journal of Fluorescence* 13, 261-265.

Millet, V., and Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141

Ministerio de la Presidencia. Boletín oficial del Estado n. 293, 8 de Diciembre de 1993.

Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., and Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.

Navarro, E., Simonet, P., Normand, P., and Bardin, R., 1992. Characterisation of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives Microbiology* 157, 107-115.

Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology* 31, 63-67.

Pooler, M. R., Ritchie, D. F., and Hatung, J. S., 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3121-3127.

Prieto, C., Jara, C., Mas, A., and Romero, J., 2007. Application of molecular methods for analyzing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348-355.

Qazi, G.N., Parshad, R., Verma, V., Chopra, C.L., Buse, R., Träger, M., and Onken, U., 1991. Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 504-507.

Quintero, Y., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2008. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* (acceptado).

Raj, K. C., Ingram, L.O., and Maupin-Furlow, J.A., 2001. Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Archives Microbiology* 176, 443-451.

Renouf, V., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 316-327.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi, O., 1997a. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 138-145.

Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi, O., 1997b. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Journal Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61, 138-145.

Schuller, G., Hertel, C., and Hammes, W.P., 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov. isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2013-2020.

Sievers, M., Sellmer, S., and Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov. a main component of industrial vinegar fermenters in Central-Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.

Sievers, M., Stöckli, M., and Teuber, M., 1997. Purification and properties of citrate synthetase from *Acetobacter europaeus*. *FEMS Microbiology Letters*. 146, 53-58.

Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M. E., Willems, A., and Velázquez, E., 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov. isolated from spoiled red wine. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 21-24.

Sokollek, S.J., and Hammes, W.P., 1997. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 481-491.



Sokollek, S.J., Hertel, C., and Hammes, W.P., 1998a. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195–206.

Sokollek, S.J., Hertel, C., and Hammes, W.P., 1998b. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935–940.

Takemura, H., Kondo, K., Horinouchi, S., and Beppu, T., 1993. Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *The Journal of Bacteriology* 175, 6857-6866.

Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., and Troncoso, A. M., 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation *Trends in Food Science and Technology* 13, 12-21.

Trcek, J., Ramus, J., and Raspor, P., 1997. Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. *Food Technology and Biotechnology* 35, 63-67.

Trcek, J., and Teuber, M., 2002. Genetic restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 208, 69-75.

Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

Trcek, J., Toyama, H., Czba, J., Misiewicz, A., and Matsushita, K., 2005. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 366-373.

Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2009. Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (submitted).

Valero, E., Roldan, P., Jiménez, C., Garcia, I., and Mauricio, J.C., 2003. Contenido en aminoácidos libres en vinagres procedentes de diferentes sustratos. P 53-58. In Mas, A. y Guillamón, J.M. (Ed). *Primeras jornadas de I+D+i en la elaboración de vinagre de vino*. Servei de publicacions, Tarragona.

Vegas, C., 2007. Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas en la producción de vinagre por el método tradicional, Diploma de Estudios Avanzados (DEA), URV.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.

Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T., 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconobacter* to the generic level. *Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61, 1244-1251.

Yamada, Y., 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2225-2227.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S, Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K., 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 823-829

Yamada, Y., and Kondo, K., 1984. *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology* 30, 297-303.

Yamada Y., and Yukphan, P., 2008. Review. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 15-24

Yamashita, S., Uchimura, T., and Komagata, K., 2004. Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 865–870.



## ***Primera Parte***

# ***ESTUDIO ECOLÓGICO DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VIÑEDOS DE CHILE***

## **Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards**

Carmen Prieto, Carla Jara, Albert Mas, Jaime Romero.

International Journal of Food Microbiology 115 (2007) 348–355



## ABSTRACT

The presence of acetic acid bacteria populations on grape surfaces from several Chilean valleys is reported. The bacteria were analysed at both the species and the strain level by molecular methods such as RFLP-PCR 16S rRNA gene, RFLP-PCR ITS 16S-23S rRNA gene regions and Arbitrary Primed (AP) PCR. Our results show that there are limited numbers of species of acetic acid bacteria in the grapes and that there is a need for an enrichment medium before plating to recover the individual colonies. In the Northernmost region analyzed, the major species recovered was a non-acetic acid bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia*. Following the North–South axis of Chilean valleys, the observed distribution of acetic acid bacteria was zonified: *Acetobacter cerevisiae* was only present in the North and *Gluconobacter oxydans* in the South. Both species were recovered together in only one location. The influence of the grape cultivar was negligible. Variability in strains was found to be high (more than 40%) for both *Acetobacteraceae* species.

**Keywords:** Grapes; *Acetobacter cerevisiae*; *Gluconobacter oxydans*; *Stenotrophomonas maltophilia*

## INTRODUCTION

Acetic acid bacteria (AAB) are Gram-negative, ellipsoidal to rod-shaped cells that have an obligatory aerobic metabolism with oxygen as the terminal electron acceptor. They can use such substrates as glucose, ethanol, lactate or glycerol as energy sources. However, most of these compounds are not completely oxidised into CO<sub>2</sub>, and water and several metabolites, especially acetic acid, are accumulated in the growth medium. AAB are commonly found in nature. Because of their high resistance to acidity and the variety of substrates that they can use, they are one of the main food spoilage microorganisms and their presence is mostly related to food modification and human activities for food preservation (De Ley et al., 1984). Acetic acid is one of the main products of AAB metabolism and it is found in many foods as the result of the presence and activity of these bacteria. It is the major volatile acid in wine, and one of the main reasons for wine spoilage (Drysdale and Fleet, 1988).

The AAB that spoil wines can be present in the cellar, although they can also originate in grapes (Gonzalez et al., 2005). It is well known that spoiled grapes and grapes infected with *Botrytis cinerea* have a high population of AAB, which can grow in grape must and accumulate gluconic and acetic acids (Barbe et al., 2001). It has also been reported that excessive growth of AAB on grape berries or in musts can lead to incomplete alcoholic fermentation, which is caused by an AAB/yeast interaction that is not fully understood (Drysdale and Fleet, 1989). Generally, spoiled grapes correlate well with increased populations of *Acetobacter* species, whereas healthy grapes show low populations of *Gluconobacter oxydans* (Du Toit and Pretorius, 2002; Gonzalez et al., 2005).

AAB species have traditionally been identified by testing physiological and chemotaxonomic abilities (De Ley et al., 1984), but these methods are not completely reliable and are time consuming. These phenotypic properties have now been complemented or replaced by such molecular techniques as DNA and rRNA hybridization methods (Urakami et al., 1989), sequence analysis (Yamada and Kondo, 1984) or various PCR methods (Bartowsky et al., 2003; Ruiz et al., 2000; Trcek and Teuber, 2002; Trcek,



2005). Some of these molecular techniques, however, are not suitable for the routine identification of bacterial isolates because they are also time consuming and difficult to use with a large number of isolates.

There is an obvious need for further studies into the ecology and development of AAB in grapes, especially in countries such as Chile where the country's isolation could be a source of new genera or species. Also, the valley structure of the vineyards could produce a variation from valley to valley. Furthermore, the economic importance of wine in Chile and the North–South climatic variation add extra interest to ecological studies of the Chilean vineyards. The availability of the aforementioned molecular methods means that these objectives may be achieved, yet it must not be forgotten that most of them have been used in very restrictive environments (wine, vinegar) where the competition with other species is limited. In the present study, we use RFLP-PCR 16S rRNA gene, RFLP-PCR ITS 16S-23S rRNA gene regions and Arbitrary Primed (AP) PCR to investigate the composition of bacterial populations (AAB and non-AAB) associated with healthy grapes in various Chilean vineyards, covering the entire geographic zone where Chilean wine is produced. We also attempted to validate these techniques for more variable environments.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling, isolation, culture conditions and maintenance of strains**

Samples of healthy grapes were obtained from several valleys in Chile between April and May 2004. The valleys were located between latitudes 30 and 36°S. From north to south they were: Limarí, Aconcagua, Casablanca, Maipo, Rapel, Curicó, Maule and BioBio. About 1 kg of grapes was obtained from at least 5 plants of each grape variety. The grape varieties analysed were Cabernet Sauvignon, Carménère, Pinot Noir, Shiraz, and Cabernet Franc and were taken in different places of each valley.

Grapes were homogenized in a Stomacher for 3 min. and 1 ml was inoculated in an enrichment medium GY (5% D-glucose, 1% yeast extract) and incubated at 30 °C for 2 days. Then, 100 µl was plated onto GYC (5% D-glucose, 1% yeast extract, 0.5% CaCO<sub>3</sub>,

2% agar w/v). Plates were incubated at 28 °C for 7–10 days under aerobic conditions. All the colonies or a maximum of twenty were randomly isolated and purified from each sample. The isolates were then grown for 48 h in the liquid medium described above. As a first screening, the isolates that produced a clear halo after acidification in GYC solid medium were selected as putative AAB and analysed further (De Ley et al., 1984).

### **Reference strains**

Several reference strains were used in this study: *Acetobacter aceti* LMG 1261, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1262, *Gluconacetobacter liquefacens* LMG 1381, *Gluconacetobacter hansenii* LMG 1527, *G. oxydans* LMG 1408, and *Gluconacetobacter xylinus* LMG 1515, all of which were obtained from the Laboratory of Microbiology of Ghent.

### **DNA extraction from bacterial isolates**

For each strain studied, 1 ml of an overnight bacterial culture was centrifuged at 10,000 ×g for 3 min and the DNA of the pelleted cells was extracted using the Genomic DNA Purification kit from Promega (Madison, WI, USA). The DNA obtained was visualized and the quantity estimated by gel electrophoresis on a 1% agarose in 1× TBE, separated at 100 V. for 30 min and then stained with ethidium bromide.

### **PCR amplification and analysis of the products**

The almost complete 16S rRNA gene and the 16S–23S rRNA gene regions were amplified as previously described using the primers described by Ruiz et al. (2000). PCR amplification products were analysed by gel electrophoresis on an 8% polyacrylamide in 1× TBE, separated at 150 V for 45 min. Gels were stained by silver nitrate following a previously described protocol (Espejo and Escanilla, 1993).

### **Restriction analysis**

Five microliters (usually 50–100 ng DNA) of each PCR amplified 16S rRNA gene and 16S–23S rRNA gene spacers from bacterial isolates was digested for 2 h with 1.5 U of *TaqI* or *AluI* restriction endonucleases, as recommended by the manufacturer (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA). Subsequently, proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to a final concentration of 0.01 µg/µl, and the reaction was incubated for 1 h at 37 °C (Romero et al., 2002). The resulting fragments were subsequently analysed by 8% polyacrylamide gel electrophoresis and silver nitrate staining, as described above.

### **Arbitrary primed-PCR and dendrograms**

Primer P3 (5'-GTAGACCCGT-3'), designed by Laohaprertthisan et al. (2003), was used for arbitrary primed amplification. The reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 10 ng of DNA template, 0.55 pmol/µl of primer P3, 2 mM Mg and 0.08 U/µl of Taq polymerase in the Invitrogen PCR buffer following the supplier's recommendations (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil). Samples were incubated for 5 min at 94 °C, and then cycled 45 times at 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. The samples were kept at 4 °C until tested. Profiles obtained from each strain belonging to the same bacterial species were compared using a binary matrix that was representative of the bands occurring in a set of AP-PCR patterns. The presence or absence of AP-PCR bands in an isolate was scored as presence (1) or absence (0) relative to the bands detectable in all the isolates in a set of AP-PCR patterns (Schafer and Muyzer, 2001). Then, the binary matrix was translated into a distance matrix using similarity calculations and a tree was constructed using the UPGMA clustering method available from Treecon version 1.3b (Van de Peer and De Wachter, 1997). Strain diversity was calculated as the percentage of different strains related to the total number of colonies analysed of the same species.

### **Sequence analysis**

PCR amplified 16S rRNA gene from the bacterial isolates was purified using Wizard PCR Preps (Promega, Madison, WI, USA) and then sequenced with an Applied Biosystems automatic sequencer (Foster City, CA, USA). The ABI Prism dye terminator sequencing kits were used with primers 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3') described by McCracken et al. (2001) and 16Sd (5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT- 3') described by Ruiz et al. (2000).

Sequences were deposited in GenBank (DQ128312–DQ128320, DQ117918–DQ117924) and aligned with reference sequences, using Sequence Match software from Ribosomal Database Project II website (RDP II; <http://rdp.cme.msu.edu/html/>) (Cole et al., 2005).

## RESULTS

### Identification of the isolates by RFLP-PCR 16S and RFLP-PCR ITS

A total of 225 isolates were obtained from grapes from the different valleys and analysed by 16S rRNA gene amplification and RFLP of the PCR product. Although the isolation protocols were designed to recover acetic acid bacteria (AAB), not all the isolates showed patterns belonging to this group. Two hundred isolates presented the expected amplified product (ca 1450 bp). Based on the RFLP with the *TaqI* enzyme it was possible to separate them into 11 more frequent groups (Table 1). The two major groups of isolates together included over 40% of the isolates and their profile was identical to that of the type strains of *G. oxydans* (group 11) and *A. aceti* (group 10).

As a second identification system, the RFLP-PCR of the ITS region was tested for the positively identified AAB. The amplicons (700 bp) from the isolates previously identified as *G. oxydans* were the same size, and the restriction fragments with *AluI* (190, 190, 175 and 110) and *TaqI* (410, 290) were the same as the type strains. On the other hand, the amplicons of the isolates identified as *A. aceti* were the same size (750) as the type strain, yet not the restriction fragments. The fragments for the *A. aceti* reference strain were 290, 130, 110 and 90 bp. However, in the Chilean isolates, fragments of approximately 430, 250 and 100 were observed in PAGE gel. Thus, the initial classification of these isolates as *A. aceti* could not be sustained.

Table 1. Total isolates and initial identification by RFLP-PCR 16S.

Group code	Number of isolates	RFLP-PCR 16S fragments sizes (bp)	Identification
1	37	150 350 850	NI
2	14	150 210 350 850	NI
3	9	210 280 850	NI
4	4	210 550 800	NI
5	6	80 210 350 850	NI
6	16	80 210 350 850	NI
7	17	80 175 190 210 350 450 580 850	NI
8	4	210 310 500 580	NI
9	4	80 350 850	NI
10	43	210 350 800	<i>Acetobacter aceti</i>
11	46	110 120 120 160 175 190 350	<i>Gluconobacter oxydans</i>

NI: Not identified as *Acetobacteraceae*.

### Identification by rRNA gene 16S sequencing

Representative isolates of all the groups were chosen for partial sequencing of the rRNA gene 16S as a method for identification. The results are summarized in Table 2, which shows that group 8 was the only one that could not be identified as there were many indeterminations in the sequence, indicating that it was probably the result of a mixture of different microorganisms. The isolates identified as *G. oxydans* were all newly identified as such on the basis of the 100% identity of the sequence obtained, including 600 bp (positions 210–840 E. coli numbering). However, group 10, initially identified as *A. aceti* by RFLP-PCR of 16S and not identified by RFLP-PCR ITS, was classified as *A. malorum*/*Acetobacter cerevisiae* on the basis of the 16S rRNA gene sequence. This sequence was identical to the ones described for the *A. cerevisiae* (T) LMG 1625 (AJ419843) and *A. malorum* (T) LMG 1746 (AJ419844) type strains. In fact, only 5 bp were found different in the 600 bp. fragment sequences between the two species *A. aceti* and *A. malorum*/*A. cerevisiae*. Further sequencing of the rRNA gene 16S involving positions 125–845 bp. (E. coli numbering) made it possible to identify the Chilean isolates as belonging to *A. cerevisiae* species. This was based on the sequences obtained, which

included differences between *A. malorum* and *A. cerevisiae* (positions 91 and 136 bp, *E. coli* numbering).

A considerable number of the isolates in groups 1, 2 and 3 also gave a RFLP-PCR 16S pattern similar to that of *A. aceti*. According to the rRNA gene 16S sequence, isolates from group 2 and 3 were classified as *Stenotrophomonas maltophilia*, whereas those from group 1 were classified as *Staphylococcus sp.* Also a group of isolates could be identified as *Lactobacillus brevis*. This was the only non-*Acetobacteraceae* isolates that were identified at the species level with the region sequenced. The other non-*Acetobacteraceae* isolates were identified as belonging to the genera *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Curtobacterium*, yet we did not attempt to characterize them further.

#### **North–South species distribution in Chilean valleys**

The distribution of species in the Chilean valleys showed a strong correlation with the latitude (Table 3). In fact, north of parallel 35 (latitude S) the only acetic acid bacteria found are *A. cerevisiae* whereas in the south the only one is *G. oxydans*. Only in one location and grape variety (Curicó, Fundo La Fortuna, Malbec) did the two species coexist. Oddly enough, in most of the northern valleys or locations (Limarí, Casablanca, Maipo and Rapel Las Cabras and Totihue) no acetic acid bacteria were recovered. No predominant genera were found in these valleys, although *S. maltophilia* was the main species in two valleys and one location and *Staphylococcus*, *Serratia* and *Enterobacter* were the dominant genera in one valley or location.

The grape variety was not seen to have any effect, and the Cabernet Sauvignon and Carmenere varieties, which were selected in several valleys, did not show any specific association with a given species. In fact, the latitude was the only relevant variable

Table 2. Identification of representative isolates of the different groups and accession codes for the sequences

Group code	Isolates code	n° of GenBank	Species
1	62	DQ117919	<i>Staphylococcus sp.</i>
	101	DQ128313	
2	12	DQ117923	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	223	DQ128317	
3	225	DQ128318	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	468	DQ128320	
4	45	DQ128312	<i>Lactobacillus brevis</i>
5	189	DQ128316	<i>Acinetobacter sp</i>
6	188	DQ128315	<i>Serratia sp</i>
7	321	DQ128319	<i>Enterobacter sp</i>
9	162	DQ128314	<i>Curtobacterium sp</i>
	127	DQ117920	
10	48	DQ117921	<i>Acetobacter cerevisiae</i>
	84	DQ117922	
	312	DQ117924	
11	65	DQ117918	<i>Gluconobacter oxydans</i>

Table 3. Distribution of AAB and the other genera isolated from grapes of different Chilean valleys

Valleys	location of vineyards	Latitude	Grapevine variety	Bacteria screened by 16S RFLP	Identified bacteria	Relative frequency %	AAB isolates codes
Limari	Punitaqui	30°45	Cabernet sauvignon	15	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> , no identificadas	88, 20	
Aconcagua	Panquehue	32°46	Cabernet sauvignon	12	<i>A. cerevisiae</i> , <i>L. brevis</i>	67, 33	21,26,28, 48
Casablanca	Casablanca	33°	Merlot	9	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> , no identificadas	56, 44	
Maipo	Antumapu	33°17	Cabernet sauvignon	12	<i>Staphylus</i> , no identificadas	83, 17	
Rapel	Las Cabras	34°	Carmenere	19	<i>Serratia</i> , <i>Acinetobacter</i>	84,16	
	Totihue	34°08	Mouvedre	17	<i>Enterobacter sp.</i>	100	
	Totihue	34°08	Cabernet sauvignon	9	<i>A. cerevisiae</i> , no identificadas	33, 67	126, 127
Curicó	Apalta	34°2	Carmenere	12	<i>Acinetobacter</i> , no identificadas	20, 30, 50	209, 210
	Fundo Molina	35°06	Cabernet sauvignon	10	<i>A. cerevisiae</i>	100	82, 84, 86, 88, 90, 93, 94, 96, 97, 99
	Fundo Molina	35°06	Carmenere	16	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Staphylococcus Curtobacterium</i>	20, 30, 25	166, 167, 174
	Fundo La Fortuna, Lontué	35°	Carmenere	11	<i>S. maltophila</i> , no identificadas	55, 45	
	Fundo La Fortuna, Lontué	35°	Cabernet sauvignon	7	<i>Gluconobacter oxydans</i> , no identificadas	71, 29	65, 67, 69, 75, 79
	Fundo La Fortuna, Lontué	35°	Tintorera	20	<i>A. cerevisiae</i>	100	301, 320
	Curicó	35°03	Shiraz	11	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100	401, 402, 406, 409, 411–414, 416, 417, 419
Fundo La Fortuna, Lontué	35°	Pinot	1	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100	292	
Fundo La Fortuna, Lontué	35°	Malbec	3	<i>Gluconobacter oxydans A. cerevisiae</i>	33, 67	341, 342/358	
Maule	Talca	35°30	Cabernet sauvignon	20	<i>Staphylococcus</i> , no identificadas	95, 5	
	Talca	35°31	Carmenere	1	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100	244
Bio-Bio	Santa Ana	36°80	Pinot	7	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100	263, 265, 268, 269, 273, 275, 278
Bio-Bio	Santa Ana	36°80	Cabernet Franc	18	<i>Gluconobacter oxydans</i> , no identificadas	89, 11	421, 423–436, 438



### Typing by AP-PCR

The strains belonging to the two species of acetic acid bacteria were further characterized by Arbitrary Primed PCR (Fig. 1). For each species a presence–absence binary matrix was used to distinguish and group isolates according to their APPCR profiles. The limited diversity observed at the species level is in strong contrast with the high diversity of strains. A total of 19 AP-PCR profiles were observed among the 43 isolates of *A. cerevisiae* (44% diversity). Most of them were represented by only one isolate, but one profile (for isolate 310, Fig. 2A) was abundant at one location. Considerable diversity was observed in *G. oxydans* isolates, because 38 AP-PCR profiles were distinguished among the 46 isolates obtained (83% diversity, Fig. 2B). In this case, most of the AP-PCR profiles observed were represented by one isolate. Each strain (or identical APPCR profile) was only present in one location for both species.

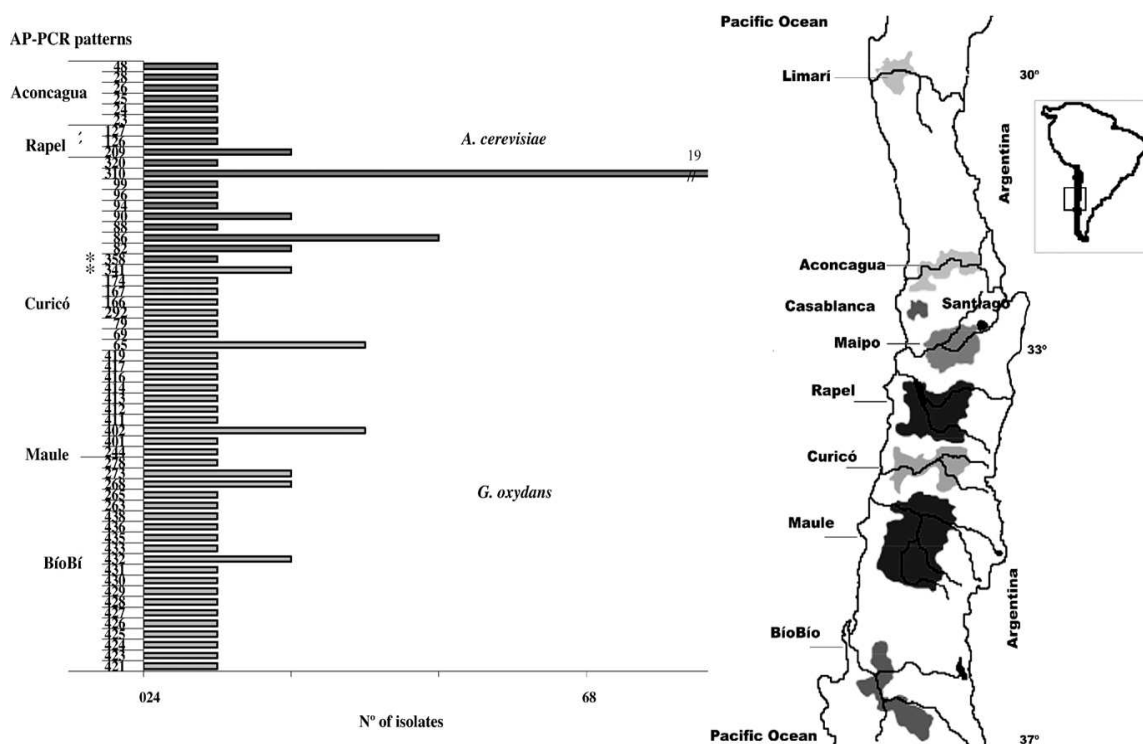


Fig. 1. Map illustrating the N–S distribution along Chilean vineyards sampled and the graphic representation of AP-PCR patterns obtained from isolates of *Acetobacter cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans* indicated the only location where both *Acetobacteraceae* species were found.

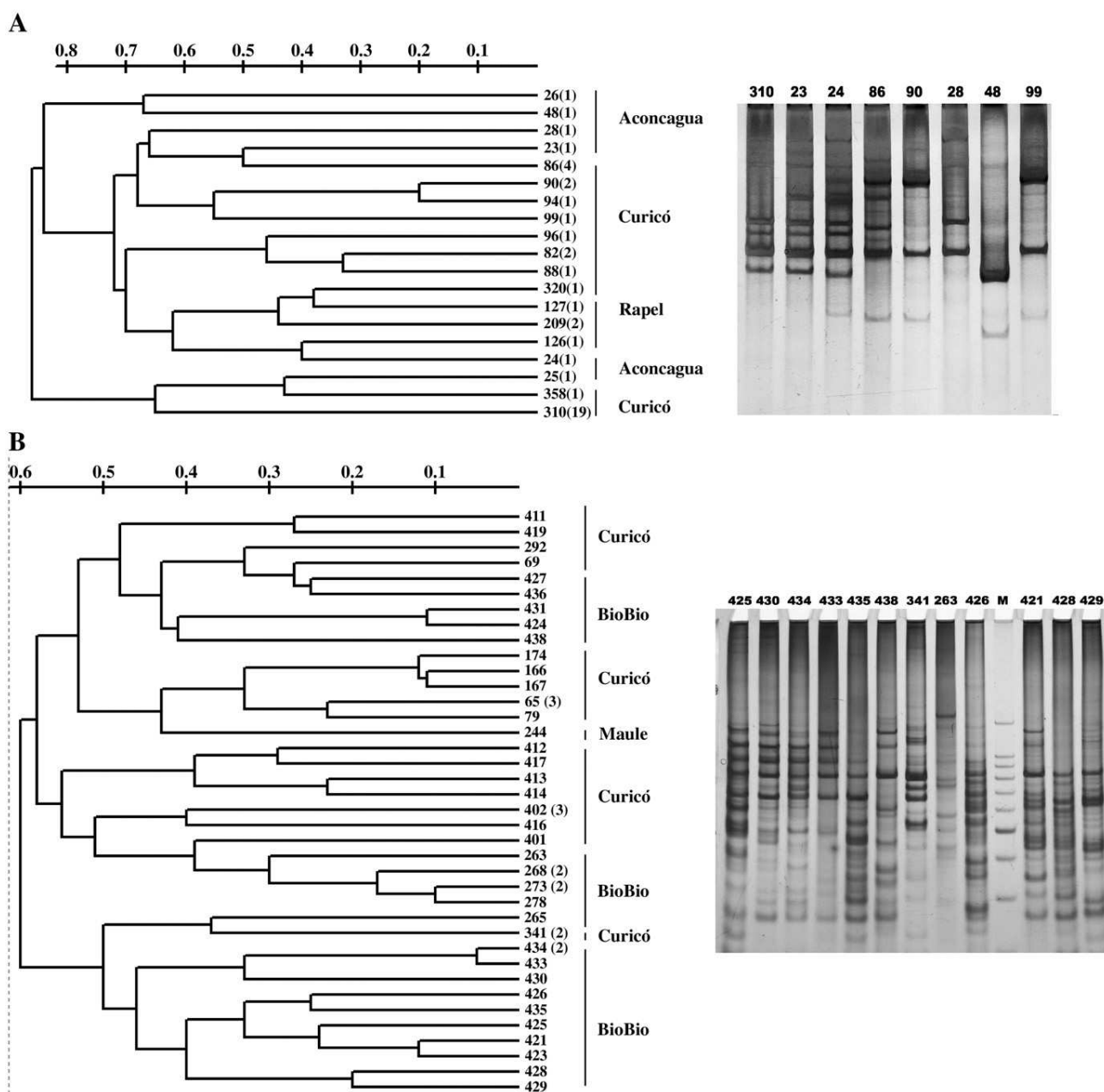


Fig. 2. PAGE of AP-PCR of the isolates of *Acetobacter cerevisiae* (A) and *Gluconobacter oxydans* (B) obtained from Chilean Valleys and dendrograms illustrating the clusters of the patterns by dissimilarity. Lanes indicate the number of the isolate, M: ladder 100 bp. Numbers in parentheses indicate the number of identical profiles obtained

## DISCUSSION

Rapid techniques for identifying different microorganisms are needed if ecological studies are to be able to process large numbers of samples. The broadly accepted techniques in bacterial taxonomy are those based on the DNA sequences, as they are not affected by the environmental conditions in which the microorganisms evolve. However, these more resolutive techniques are so expensive and time consuming that they are not suitable for such studies. On the other hand, short-cut techniques are normally used for certain kinds of environments, in which the population is restricted or limited by the environment itself. In the case of acetic acid bacteria, most taxonomic studies that describe new genera or species have been done by selective isolation and sequencing, or DNA–DNA hybridization (Urakami et al., 1989; Yamada and Kondo, 1984). On the other hand, for routine analysis AAB have normally been identified by RFLP-PCR of rRNA gene 16S (Ruiz et al., 2000), ITS 16S–23S (Ruiz et al., 2000; Trcek and Teuber, 2002), or, recently, by PCR of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase gene (PQQ-ADH) (Trcek, 2005). These techniques have been developed for those environments in which acetic acid bacteria are frequently regarded as a problem or as a necessary agent: for example, wine (Gonzalez et al., 2004, 2005) or vinegar (Trcek, 2005), respectively. However, they have hardly been used to detect AAB in other more open and competitive environments, such as grapes in open fields. Of all those who have previously used these techniques, only Gonzalez et al. (2005) have determined AAB in grapes. They found mostly *G. oxydans* and *A. aceti* with no other contaminant microorganisms.

The findings of previous reports and the limited amounts observed in the Chilean vineyards are different for various reasons. One of these is the technique used for identification, which used to be based on selective media and physiological identification (Joyeux et al., 1984; Du Toit and Lamberchts, 2002; Barbe et al., 2001). Later on, and on the basis of similar molecular methods, Gonzalez et al. (2005) used cycloheximide–penicillin in the media to prevent the proliferation of other bacteria. In this study, however, because growth was limited or null, we decided to allow all bacteria to grow and thus avoid losing AAB diversity, although this involved an obvious risk of increasing the population of other

bacteria. Another reason for the difference may be the health status of the grapes, which was excellent in the present study, as observed by the poor recovery of bacteria and also for their identity.

*G. oxydans* has been observed on the grape surface in almost all the studies made to date on the presence of acetic acid bacteria in both spoiled and healthy grapes (Joyeux et al., 1984; Du Toit and Lamberchts, 2002; Barbe et al., 2001; Gonzalez et al., 2005). Other species, mostly *A. aceti*, have also been found in spoiled grapes (Joyeux et al., 1984), and in both spoiled and healthy grapes, although with higher counts in spoiled grapes (Gonzalez et al., 2005). In all the cases reported, all the species were found to coexist. A clear difference between this study and the others is that we found little coexistence of both AAB species (only in one location) and the distribution was clearly latitude dependent. The presence of *A. cerevisiae* instead of *A. aceti* deserves some mention. The recent description of *A. cerevisiae* (Cleenwerk et al., 2002) makes impossible its detection in previous works (Joyeux et al., 1984; Barbe et al., 2001; Du Toit and Lamberchts, 2002). However, Gonzalez et al. (2006) could have detected it as they used a combination of several restriction enzymes that discriminate among *A. aceti*, *A. pasteurianus* and *A. cerevisiae*. Thus, the most likely situation is that *A. cerevisiae* may be absent from European vineyards. The lack of initial discrimination between *A. cerevisiae* and *A. malorum* is because they are extremely similar. If these strains are to be identified at species level, genotypic characterization is required, because phenotypic characteristics are very similar (Cleenwerk et al., 2002). Their % G+C content values were similar, and their 16S rRNA gene sequences were more than 99.9% similar (Cleenwerk et al., 2002). This similarity between them makes discrimination more difficult and justifies the use of other more discriminating techniques (i.e. full sequencing of the 16S rRNA gene, DNA DNA hybridization). Their name indicates their origin because so far all the isolates that have been identified as *A. cerevisiae* (except one which has no indication of origin) have originated in beer or breweries (Cleenwerk et al., 2002). Thus, this is the first time that an isolate of *A. cerevisiae* has been found in the environment and in a completely different niche.

The fact that other AAB such as *A. aceti* or *A. pasteurianus* (Joyeux et al., 1984; Gonzalez et al., 2005), *G. liquefaciens* (Du Toit and Lamberchts, 2002) or *G. hansenii* (Gonzalez et al., 2005) have not been reported in grapes from the Chilean valleys cannot be attributed only to the limitations of sample collection or growth in the solid media, as these were the same in other studies in which the counts were also very low (102–103 cfu/g). The isolation of Chilean viticulture, and particularly the absence of the phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch) and other phytopathogens or vectors, probably accounts for the lack of AAB “contamination”. The valley structure may also enhance the isolation, as can be seen by the clearly defined North–South distribution of the two species found and the fact that they do not coexist.

Other species and genera are ubiquitous, and microorganisms are generally present in plants and soils. It is therefore no surprise to find them on grapes. Some of these genera, including AAB, have been reported in association with insects or nematodes, which can act as vectors (Dillon and Dillon, 2004). This could be the case of *Stenotrophomonas* (Pidiyar et al., 2004; Mohr and Tebbe, 2006) or *Enterobacter* (Behar et al., 2005). Some of the genera have also been reported in association with plants, and even act as plant growth promoters (Behrendt et al., 2002). *Serratia* isolates have been associated with cucurbit yellow vine disease and have been detected in bee gut (Zhang et al., 2003; Mohr and Tebbe, 2006). Some reports indicate that strains belonging to genus *Stenotrophomonas* can degrade some herbicides (Schoenborn et al., 2004; Barreiros et al., 2003) and, thus, could be selectively favoured in crops, as in vineyards. In summary, these genera contain strains of great variability and with the ability to survive. Most of them have been described in association with insect or plants. Therefore, it is not surprising that these bacteria are recovered from grapes. Strain characterization by AP-PCR has been used to type AAB strains that originated in wine and which were identified as *A. pasteurianus* species (Bartowsky et al., 2003). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR) (Nanda et al., 2001; Gonzalez et al., 2004) have also been proposed as methods for typing strains. In all cases, considerable diversity has been observed, as in our results. Diversity accounting about 50% of the total isolates was found on grape surfaces. This diversity decreased during wine fermentation (Gonzalez et al., 2005), wine storage (Bartowsky et al., 2003) and vinegar

production (Nanda et al., 2001), although in all cases strain diversity was still high. All these results show that these methods are appropriate for typing AAB strains.

The diversity of *G. oxydans* is greater than that of *A. cerevisiae*, which agrees with the observations of Gonzalez et al. (2005). This can be understood as a tendency to high variability in a species that is only present in natural environments, whereas the *Acetobacter* species can be found and selected in more selective man-made environments (cellars, vinegar production plants, etc).

In conclusion, this is the first time that the distribution of AAB in the Chilean vineyards has been studied. They are difficult to isolate and their recovery is poor, which may be correlated to the healthy status of the grapes. Two AAB species were found with a very limited overlap between them. One of them, *G. oxydans*, has always been reported to be present in grapes from different origins, whereas the other, *A. cerevisiae*, has not previously been described in natural habitats. However, the strain diversity is very high as has been reported in other natural habitats.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work is the result of joint collaboration agreements funded by AECI (Agencia Española de Colaboración Internacional); CONICYT (Chile)–DURSI (Generalitat de Catalunya) and Grant AGL2004-07494-C02-02/ALI from the government of Spain. The authors thank the Language service of the University Rovira i Virgili for revising the manuscript.

## REFERENCES

- Barbe, J.C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 2001. Role of botrytized grape microorganisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 90, 34–42.
- Barreiros, L., Nogales, B., Manaia, C.M., Silva Ferreira, A.C., Pieper, D.H., Reis, M.A., Nunes, O.C., 2003. A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. *Environmental Microbiology* 5, 944–953.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36, 307–314.
- Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E., 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology* 14, 2637–2643.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., Suzuki, K., 2002. Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; a polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1441–1454.
- Cleenwerk, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J., 2002. Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum*, sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1551–1558.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2005. The Ribosomal Database Project (RDPII): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33, D294–D296. doi:10.1093/nar/gki038 (Database Issue).

De Ley, J., Gillis, M., Swings, J., 1984. Family VI Acetobacteraceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Berge's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 267–278. Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology* 49, 71–92.

Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 143–154.

Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 471–481.

Du Toit, W.J., Lamberchts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57–64.

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology* 52, 155–179.

Espejo, R., Escanilla, D., 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using “primer–dimer” formation as an internal control of amplification. *Research in Virology* 144, 243–246.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853–860.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during a wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102, 295–304.



González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., Poblet, M., 2006. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108, 141–146.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153–156.

Laohaprertthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C., Nishibuchi, M., 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiology and Infection* 130, 395–406.

McCracken, V., Simpson, J., Mackie, R., Gaskins, H., 2001. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *Journal of Nutrition* 131, 1862–1870.

Mohr, K.I., Tebbe, C.C., 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology* 8, 258–272.

Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentations of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986–990.

Pidiyar, V.J., Jangid, K., Patole, M.S., Shouche, Y.S., 2004. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 597–603.

Romero, J., García-Varela, M., Laclette, J., Espejo, R., 2002. Bacteria clustering with *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microflora (*Tiostrea chilensis*). *Microbial Ecology* 44, 365–371

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981–1987.

Schafer, H., Muyzer, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. In: Paul, J. (Ed.), *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*. Academic Press, London, pp. 425–468.

Schoenborn, L., Yates, P.S., Grinton, B.E., Hugenholtz, P., Janssen, P.H., 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4363–4366.

Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735–745.

Trcek, J., Teuber, M., 2002. Genetic restriction analysis of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 19, 69–75.

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., Komagata, K., 1989. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 50–55.

Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Computer Applications in the Biosciences* 13, 227–230.

Yamada, Y., Kondo, K., 1984. *Gluconacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 30, 297–303.

Zhang, Q., Weyant, R., Steigerwalt, A.G., White, L.A., Melcher, U., Bruton, B.D., Pair, S.D., Mitchell, F.L., Fletcher, J., 2003. Genotyping of *Serratia marcescens* strains associated with cucurbit yellow vine disease by repetitive elements-based polymerase chain reaction and DNA–DNA hybridization. *Phytopathology* 93, 1241–1246.



## ***SEGUNDA PARTE***

# ***COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS ACÉTICAS PROCEDENTES DE VINOS Y VINAGRES***

**Analysis of several methods for the extraction of high quality  
DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for  
characterization by PCR-based methods**

Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Torija, M.J.\* and Mas, A.

International Journal of Food Microbiology 128 (2008) 336–341



## ABSTRACT

Acetic Acid Bacteria (AAB) are fastidious microorganisms with poor recovery in culture. Culture-independent methods are currently under examination. Good DNA extraction is a strict requirement of these methods. We compared five methods for extracting the DNA of AAB directly from wine and vinegar samples. Four matrices (white wine, red wine, superficial vinegar and submerged vinegar) contaminated with two AAB strains belonging to *Acetobacter pasteurianus* and *Gluconacetobacter hansenii* were assayed. To improve the yield and quality of the extracted DNA, a sample treatment (washing with polyvinyl pyrrolidone or NaCl) was also tested. DNA quality was measured by amplification of the 16S rRNA gene with conventional PCR. DNA recovery rate was assessed by real-time PCR. DNA amplification was always successful with the Wizard method though DNA recovery was poor. A CTAB-based method and NucleoSpin protocol extracted the highest DNA recoveries from wine and vinegar samples. Both of these methods require treatment to recover suitable DNA for amplification with maximum recovery. Both may therefore be good solutions for DNA extraction in wine and vinegar samples. DNA extraction of *Ga hansenii* was more effective than that of *A. pasteurianus*. The fastest and cheapest method we evaluated (the Thermal shock protocol) produced the worst results both for DNA amplification and DNA recovery.

**Keywords:** Real Time PCR, DNA extraction, 16S rRNA gene, DNA recovery.

**Running title:** Methods for acetic acid bacteria DNA extraction

## INTRODUCTION

Acetic acid bacteria (AAB) are important microorganisms in the food industry because of their ability to oxidize sugars and alcohols. While their activity sometimes causes food spoilage (in wines, beer, grapes and other fruits, etc.), they are also the main actors in the production of vinegar. Correct and fast enumeration and identification protocols are needed to suitably control the process. One of the biggest hurdles when studying AAB is their cultivation, growth and maintenance in pure culture, especially when isolated from high ethanol and/or acetic acid sources such as wine and vinegar (Entani et al., 1985, Sievers, et al., 1992, Gullo et al., 2006). These extreme media are responsible for the limited culture recovery of a significant number of microbiota (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Trcek, 2005). AAB are considered “fastidious microorganisms”, mainly because of their inability to recover a part of the population that, though viable, in adverse conditions enters into a non-culturable state (McDougald et al., 1998; Fleet, 1999; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Giraffa and Neviani, 2001). With AAB, it has been reported that conventional plate counts are considerably lower than the fluorescence optical counts of microbial cells from industrial acetators (Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006).

To overcome the disadvantages of culture-dependent methods, therefore, in recent years several molecular techniques based on PCR have been successfully used to detect bacteria without cultivation in foods (reviewed by Fleet, 1999 and Giraffa, 2004). However, the validity and robustness of the results obtained from such molecular techniques depend on the efficient recovery of bacterial DNA. DNA extraction is usually affected by factors such as incomplete cell lysis, DNA sorption to a particular material, coextraction of enzymatic inhibitors and degradation or damage of DNA (Miller et al., 1999). Clearly, the application of a suitable DNA extraction protocol for a specific sample is essential for correct microbial diversity estimation.

The DNA extraction method must be simple, quick and efficient. Safety, cost and DNA quality must also be considered. DNA quality is critical because the efficiency of PCR amplification can be reduced by inhibitors from the matrix. DNA extraction has therefore



been highlighted as a limitation of culture-independent methods (Abriouel et al., 2006; Cankar et al., 2006).

With wine and vinegar, which are complex matrices, the presence of polysaccharides and a range of polyphenolics (including tannins) can interfere with enzymatic reactions and even degrade the DNA during direct DNA extraction (Do and Adams, 1991; Demeke and Adams, 1992; Wilson, 1997). No standardized DNA extraction method is yet available for wine and vinegar and all described methods involve chemical and enzymatic lysis. These methods often combine detergents, physical disruption, solvent extraction and enzymatic lysis to obtain crude extracts of nucleic acid (Sokollek et al, 1998; Nanda et al., 2001; González et al., 2004; Gullo et al., 2006; Haruta et al., 2006; Ndoeye et al., 2006).

To optimize the detection of AAB from wine and vinegar samples and minimize these limitations, we evaluated five nucleic acid extraction methods on the basis of DNA PCR amplification quality and recovery. Amplification of 16S rRNA gene was assessed by conventional PCR and taken as an indicator of good DNA extraction. Real-time quantitative PCR was used to evaluate the reaction efficiency by quantifying DNA recovery.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strain and media**

The reference strains used in this study were *Acetobacter pasteurianus* (LMG 1262<sup>T</sup>) and *Gluconacetobacter hansenii* (DSMZ 5602<sup>T</sup>). These strains were grown in 30 ml of Glucose medium (GY: 1% yeast extract; 1% glucose, w/v) (Cultimed, Barcelona, Spain) for 3-5 days at 30°C. Each day the number of cells per ml was determined by microscopic counting until the population was 108 cell ml<sup>-1</sup>, which was the cell size used for DNA extraction. ml volume of the growth medium was centrifuged and the pellet was washed with sterile deionized water and stored at -20°C until used. All experiments were done in triplicate.

### **Artificial contamination of media**

We compared the effect of several media or matrices on the DNA extraction process. Cultures with known populations of *A. pasteurianus* or *Ga. hansenii* (1\*108 cel ml<sup>-1</sup>) were

incubated for 24 h at 13°C in two (red and white) wines and two vinegars produced by submerged (commercial vinegar) and superficial (traditional vinegar) methods previously sterilized by filtration. After incubation the cells were recounted using the LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability kit provided by Molecular Probes, Inc.

### **Sample Treatments**

Cultures (1 ml) were centrifuged and the pellets were treated with several compounds in order to compare their effect on DNA extraction:

- a) No treatment (NT): pellets were only washed with deionized water;
- b) PVP: pellets were washed twice with a solution of EDTA-PVP (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA and 2% (v/w) polyvinyl pyrrolidone (PVP));
- c) NaCl: pellets were resuspended in a solution of NaCl (115 1%) and frozen overnight. The samples were then centrifuged and washed with deionized water to eliminate NaCl. All treatments were done in triplicate and the pellets were frozen at -20°C until processed.

### **DNA extraction protocol**

DNA extraction protocols are summarized in Table 1.

#### CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) method.

DNA extraction was prepared according to the CTAB method described by Ausubel et al. (1992).

#### Thermal shock method

This method consists of freeze-thaw disruption (González et al., 2006). Pellets were resuspended in 1 ml of water and frozen at -20°C. The samples were then heated for 15 min at 95°C and centrifuged to recover the supernatant. This supernatant was used for DNA quantification and PCR analysis.

#### Mo-Bio method

A commercial Power Soil DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Inc) was used according to the protocol described by manufacturers.

#### NucleoSpin method

The samples were analyzed with the Genomic DNA kit from NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations.

#### Wizard method

The samples were analyzed with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the protocol for isolating genomic DNA from Gram-negative bacteria. Because of the high glucan production of AAB when grown in vinegar, the protocol used in DNA extraction these samples was that described for Gram-positive bacteria. This method has some previous steps: cells were resuspended in 480  $\mu$ l of 50 mM EDTA and after that 120  $\mu$ l of lysozyme (Roche Diagnostics) were added. Cells were incubated for 1 h at 37 °C and after centrifugation, the supernatant was removed. From this point, both protocols were identical

Table 1. General description of each DNA extraction method used in this study.

Method name	Description	Basis	Material cost per sample (€)	Time consumed per 20 samples (hours)	Special advantages
<b>CTAB</b> <b>(A)</b>	reagents prepared in-house	Cell-lysis by chemical and enzymatical methds (CTAB and proteinase K). Isopropanol precipitation	0,65	4	Economical, widely used
<b>Thermal shock</b> <b>(B)</b>	95°C for 15 min	cell-lysis by heating	0	0,5	The fastest and most economical
<b>Mo-Bio</b> <b>(C)</b>	PowerSoil DNA isolation kit (Mo-Bio)	Cell-lysis by mechanical and chemical methods. (bead-grinding); silica membrane in a spin-column format	3,43	2	Method for cell disruption. Intended for use with environmental samples containing a high humic content
<b>NucleoSpin</b> <b>(D)</b>	Genomic DNA from Food (NucleoSpin from Macherey-Nagel)	Cell-lysis by chemical and enzymatical methods (denaturing agents, detergents and proteinase K); silica membrane in a spin column format	3,88	1,5	Fast and effective purification from various matrices. Good recovery for small genomic DNA fragments (< 1 kb) out of processed, complex food matrices
<b>Wizard</b> <b>(E)</b>	Wizard Genomic DNA purification kit (Promega)	Cell-lysis by chemical and enzymatical methods. Isopropanol precipitation	1,81	2,5 (Gram negative protocol) 3,5 (Gram positive protocol)	Better scalability, more economical than other commercial kits

### **PCR inhibition assay**

To determine whether PCR inhibitors were present in the purified DNA extracts, we amplified the 16S rDNA gene using the method described by Ruiz et al. (2000). Primers were designed on the basis of conserved regions of the 5'-end (16Sd, 5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') and the 3'-end (16Sr, 5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3') of the 16S rRNA gene. The reactions were carried out in Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

In all cases, amplified DNA was detected by electrophoresis on a 1.0% (w/v) agarose gel in TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide and photographed. Each amplification was done in triplicate.

### **DNA recovery**

The DNA concentration of each extract was determined using a fluorometer (Qubit, Invitrogen) according to the manufacturer's specifications.

DNA estimation was also done by Real-Time PCR (RT-PCR). The amplification of the 55 base pairs (bp) fragments of the 16S rRNA gene was carried out as described by González et al. (2006). The primers used were designed from the conserved part of this gene (AQ1F, (5'-TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3') and AQ2R, (5'-CGCCATTGTAGCACGTGTGTA-3')) and were specific for AAB. Reactions were run on a GeneAmp 5700 Sequence detection system (Applied Biosystems). All tests were performed in triplicate in the same run.

The cycle threshold (CT), was calculated as the cycle number at which the concentration increase became exponential. The recovery was calculated in relation to the minimal CT obtained for each strain in culture medium and the no-template control (NTC).

$$\% R = (((NTC - CT \text{ minimal}) - (CT \text{ sample} - CT \text{ minimal})) / (NTC - CT \text{ minimal})) * 100$$

### **Statistical analysis**

We evaluated the effect of the matrix, extraction method, treatment and species using four-way ANOVA with Sheffe's and b-Tukey's post tests (except for species variable since only two species were used). All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 for Windows. A suitable control was considered for each variable. For the matrix effect the

control was the recovery obtained in GY medium. For the extraction method the control was the highest DNA recovery in GY medium for each species. Samples without treatment (NT) were the controls for treatments. *A. pasteurianus* was used as control for species.

## RESULTS

### PCR inhibition assay

To estimate the quality of the DNA obtained from both species before and after treatments with the extraction protocols, we used a PCR system based on amplification of 16S rRNA gene and visualization onto agarose gel (Table 2). To validate the methods, we tested four matrices (white and red wines, commercial and traditional vinegars) using GY medium as control. Our results were similar for both species. Amplification was generally good when DNA extracted from cells grown in GY medium was used. The only exception was with the Thermal shock method, with which no amplification was achieved with any species. However, when we considered matrices and treatments, the results were much more complex. Amplification with direct extraction (NT) was possible with Mo-Bio and Wizard methods for all matrices. However, except for white wine in CTAB method, a treatment was needed to produce a signal on the gel with CTAB and NucleoSpin protocols. Surprisingly, these treatments seemed to be deleterious for samples treated with Mo-Bio method, especially with strain *A. pasteurianus* 1262. According to this assay, therefore, Wizard method appeared to be the best.

Table 2. DNA PCR amplification after the different extraction methods considering the matrix and pre-treatment used in both species.

TREATMENTS	DNA EXTRACTION METHODS										
	A		B		C		D		E		
	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	
<b>WW</b>	w/o tr	<sup>1</sup> +	+	-	-	+	+	-	-	+	+
	NaCl	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
	PVP	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>RW</b>	w/o tr	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	NaCl	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	PVP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>CV</b>	w/o tr	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	NaCl	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
	PVP	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<b>TV</b>	w/o tr	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	NaCl	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	PVP	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<b>MEDIUM GY</b>		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> +: signal detected on agarose gel; -: no signal detected. Results obtained by triplicate.

### **DNA recovery**

No DNA was visible on gel after DNA extraction from any of the methods and matrices, and only DNA extracted from GY samples could be measured by fluorometry. A more sensitive method for DNA estimation was therefore needed, and Real-Time quantitative PCR (RT-PCR) was an ideal alternative. This method was also useful for the quality assessment of the extracted DNA because the presence of impurities or PCR inhibitors would be reflected at low levels of detection. For the RT-PCR analysis, DNA extracted from AAB cells grown in GY was used as control and compared to DNA extracted from matrices in order to calculate DNA recovery. This recovery was defined as the percentage of DNA extracted from every sample in relation to the DNA obtained in GY medium. Here the lowest Ct indicates the maximum amount of possible DNA (100%) from the cells used. As the maximum DNA extracted was species- and method dependent, a different control had to be established for each species. Maximum extraction was obtained with Wizard method for *A. pasteurianus* and with CTAB method for *Ga. hansenii* (Table 3). The highest recoveries therefore indicated the best methods and treatments for each matrix since they indicated that the amount of DNA obtained was nearest to the maximal. With the exception of NucleoSpin method for *Ga. hansenii*, which was less than 60%, Thermal shock method exhibited the lowest recovery in GY medium.

In general, all matrices had a strong negative effect on DNA extraction as there was a clear reduction in recovery in relation to the glucose medium. For both wines and species, recovery was highest for samples treated with PVP and extracted with CTAB method. With this method, DNA recovery was highest in *Ga. hansenii* (over 90%), compared with around 80% in *A. pasteurianus*. For *Ga. hansenii* recovery was over 70% in white wine and 60% in red wine when the best treatment was considered for each extraction method. *A. pasteurianus* showed very similar DNA recovery (around 70%) when extracted with NucleoSpin and Wizard methods and treated with PVP. In general, extractions performed with Thermal shock and Mo-Bio methods yielded poor DNA recovery (less than 40%). Maximum recovery was lower for vinegar samples (60–78%), which confirms that vinegar is a more complex and difficult matrix than wine. As with wine, the best DNA extraction methods were NucleoSpin and CTAB with sample treatment. There were no significant differences in recovery between sample treatments in these protocols. However, with Mo-



Bio and Wizard methods the effect of treatment in DNA extraction depended on the matrix and species evaluated. Between species there were no differences in DNA recovery, except for traditional vinegar extracted with CTAB protocol, where the recovery was always highest for *Ga. hansenii*. With Thermal shock method the results in *A. pasteurianus* were unexpected since DNA was recovered at around 60% after treatment with PVP whereas no DNA was detected without treatment. In the best extraction methods for AAB, CTAB and NucleoSpin, the amount of DNA extracted in samples with high concentrations of polyphenols (red wine and red wine vinegar) was higher after treatment with PVP or NaCl. Treatments were less important for white wines.

Table 3. DNA recovery ( $R \pm SD$ ) after different extraction methods considering the matrix and pre-treatment in both species.

TREATMENTS	DNA EXTRACTION METHODS										
	A		B		C		D		E		
	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	<i>A. past</i>	<i>Ga. hans</i>	
<b>WW</b>	w/o tr	74,45±7,43 <sup>1a</sup>	81,17±5,62 <sup>a</sup>	35,48±10,02 <sup>ab</sup>	73,05±11,64 <sup>d</sup>	nd <sup>2</sup>	72,43±1,60 <sup>d</sup>	46,21±3,21 <sup>ab</sup>	22,57±2,00 <sup>abd</sup>	70,42±4,48 <sup>a</sup>	76,34±5,86 <sup>a</sup>
	NaCl	53,37±0,41 <sup>bc</sup>	87,51±5,88 <sup>nd</sup>	22,34±2,28 <sup>ab</sup>	53,12±6,17 <sup>abcd</sup>	38,30±4,56 <sup>abc</sup>	55,33±23,58 <sup>a</sup>	66,86±2,50 <sup>abc</sup>	79,59±0,42 <sup>acd</sup>	54,14±3,46 <sup>ac</sup>	50,70±5,31 <sup>abc</sup>
	PVP	89,17±3,98 <sup>b</sup>	93,40±3,76	61,89±1,31 <sup>abc</sup>	87,03±1,42 <sup>nd</sup>	25,12±0,62 <sup>abc</sup>	55,67±2,19 <sup>abd</sup>	74,31±4,90 <sup>ac</sup>	83,50±0,97 <sup>abc</sup>	73,83±5,64 <sup>a</sup>	53,26±1,34 <sup>abcd</sup>
<b>RW</b>	w/o tr	34,09±8,87 <sup>a</sup>	23,49±7,00 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	34,79±27,34 <sup>nd</sup>	11,59±2,34 <sup>ab</sup>	58,25±2,78 <sup>bd</sup>	55,69±19,33 <sup>a</sup>	61,61±6,03 <sup>ab</sup>
	NaCl	78,16±6,08 <sup>abc</sup>	88,50±4,31 <sup>bc</sup>	nd	nd	nd	75,48±3,38 <sup>bd</sup>	69,24±3,56 <sup>ac</sup>	68,08±3,97 <sup>b</sup>	67,96±3,96 <sup>a</sup>	44,87±4,33 <sup>abcd</sup>
	PVP	75,55±0,74 <sup>bc</sup>	96,54±2,66 <sup>nd</sup>	nd	nd	35,80±6,69 <sup>abc</sup>	52,31±1,03 <sup>abd</sup>	71,97±2,95 <sup>ac</sup>	75,24±3,46 <sup>abc</sup>	72,47±2,56 <sup>a</sup>	58,17±1,77 <sup>abd</sup>
<b>CV</b>	w/o tr	26,04±7,58 <sup>ab</sup>	35,00±1,43 <sup>a</sup>	1,48±0,29 <sup>ab</sup>	31,76±0,09 <sup>abd</sup>	44,40±3,57 <sup>a</sup>	nd	9,31±3,08 <sup>ab</sup>	17,04±1,76 <sup>abd</sup>	44,33±2,23 <sup>a</sup>	53,55±0,63 <sup>abd</sup>
	NaCl	60,59±2,92 <sup>bc</sup>	65,55±2,24 <sup>bc</sup>	31,82±1,68 <sup>abc</sup>	41,53±2,35 <sup>abcd</sup>	42,54±3,65 <sup>a</sup>	6,80±0,76 <sup>acd</sup>	66,14±4,63 <sup>abc</sup>	71,72±2,87 <sup>ac</sup>	50,52±2,63 <sup>a</sup>	38,76±7,31 <sup>ab</sup>
	PVP	60,42±0,12 <sup>bc</sup>	60,96±2,85 <sup>bc</sup>	58,67±3,28 <sup>bc</sup>	nd	8,71±3,48 <sup>abc</sup>	24,66±1,90 <sup>acd</sup>	71,23±0,78 <sup>abc</sup>	67,33±0,21 <sup>cd</sup>	52,71±1,85 <sup>ac</sup>	59,10±4,94 <sup>a</sup>
<b>TV</b>	w/o tr	13,27±1,36 <sup>ab</sup>	29,75±6,79 <sup>nd</sup>	nd	nd	45,79±5,63 <sup>ab</sup>	44,72±39,62	7,72±1,56 <sup>ab</sup>	18,79±1,90 <sup>nd</sup>	32,14±1,03 <sup>a</sup>	61,22±4,79 <sup>nd</sup>
	NaCl	61,65±2,96 <sup>bc</sup>	78,67±1,73 <sup>acd</sup>	nd	nd	nd	54,83±4,02 <sup>abd</sup>	68,06±2,39 <sup>abc</sup>	64,86±0,08 <sup>bc</sup>	58,10±1,03 <sup>ac</sup>	39,72±1,75 <sup>abcd</sup>
	PVP	58,57±1,44 <sup>bc</sup>	77,24±3,92 <sup>acd</sup>	61,75±2,12 <sup>bc</sup>	nd	11,36±0,72 <sup>abc</sup>	35,23±0,46 <sup>abd</sup>	67,73±3,09 <sup>abc</sup>	70,29±1,10 <sup>ac</sup>	60,86±1,56 <sup>ac</sup>	57,25±3,16 <sup>ab</sup>
<b>MEDIUM GY</b>		99,13±4,89	99,98±2,03	86,99±4,97 <sup>b</sup>	76,19±3,62 <sup>bd</sup>	96,59±0,98	99,86±0,67 <sup>d</sup>	98,51±4,04	59,73±2,98 <sup>bd</sup>	100±3,18	93,91±1,01
	[DNA] $\mu\text{g ml}^{-1,3}$	6,43±2,14	5,72±0,42	0,47±0,14 <sup>b</sup>	0,50±0,02 <sup>b</sup>	9,45±0,55 <sup>b</sup>	6,33±0,86 <sup>d</sup>	3,47±1,77	0,08±0,05 <sup>bd</sup>	4,81±0,87	1,25±0,64 <sup>bd</sup>

<sup>1</sup> Results obtained by triplicate, <sup>2</sup> nd: not detected, <sup>3</sup> DNA concentration was obtained by fluorometry, <sup>a</sup> Significant differences due to the matrix in relation to the control (medium GY). <sup>b</sup> Significant differences due to the extraction method according to the control. Method E and A are the control of *A. pasteurianus* and *Ga. hanseni*, respectively, <sup>c</sup> Significant differences due to the pretreatment used in relation to the sample without treatment (w/o tr), <sup>d</sup> Significant differences between both species using *A. pasteurianus* as control. The results were expressed as percentage±SD of the highest DNA concentration recovered.

## DISCUSSION

Ideally, DNA extraction methods should be simple, quick and efficient. Choosing an extraction method often involves a trade-off between cost (materials and labor), the optimal yield of DNA and the removal of substances that could influence the PCR reaction (Cankar et al., 2006). It is necessary, therefore, to carefully validate the suitability of a method for specific samples. The main criteria for this validation are based on quantitative and qualitative analysis.

Today the direct lysis method is primarily used. Many methods have been published for DNA extraction from various natural and complex samples, including compost, sediment, soil and many food commodities (Zimmermann et al., 1998; Holden et al., 2003; Giacomazzi et al., 2005; Smith et al., 2005; Abriouel et al., 2006, Cook and Britt, 2007, Yang et al., 2007). Most of these methods comprise physical or chemical procedures for *in situ* cell disruption, such as grinding, freezing-thawing, bead beating, heat treatment and detergent lysis followed by phenol/chloroform or resin-based DNA extraction.

In contrast, the extraction of DNA from vinegar samples has rarely been studied or optimized, so there is a lack of standardized methods. In previous studies (Nanda et al., 2001; González et al., 2004; Gullo et al., 2006, Trcek et al., 2005; Haruta et al., 2006; Prieto et al., 2007). DNA was extracted from vinegar or wine AAB after isolation onto the appropriate agar media and even after enrichment. However, these conventional culture dependent methods are time-consuming. More importantly, information about the bacterial population is lost because of poor AAB culturability (Sokollek et al., 1998; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Arnold et al., 2002; Mesa et al., 2003).

We therefore sought an optimal method for AAB-DNA extraction directly from wine and vinegar samples. Five methods were assessed for quality and yield of the extracted DNA in four matrices (white and red wines, commercial and traditional vinegars). These were three commercial kits widely used in DNA extraction from all type of samples, plus the CTAB and Thermal shock protocols as two cheap alternatives to these commercial methods. All samples were analyzed before and after two treatments (NaCl and PVP). These treatments have been developed to obtain suitable DNA from matrix samples with specific problems such as high polysaccharide content or the presence of polyphenols (Phister and Mills,

2003). The species used (*A. pasteurianus* and *Ga. hansenii*) in this study were chosen as representative AAB species because both species have been isolated in both matrices analysed (wine and vinegar). However, it is relevant to mention that the best methods described in this study have been used for the extraction of DNA from other representative AAB species in wine and vinegar such as *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans* and *Gluconacetobacter europaeus* with similar results.

### **PCR inhibition assay**

In the first assay, the quality of the DNA and the presence of inhibitors were tested using the amplification of the 16S rRNA gene by conventional PCR. The effect of the extraction methods on DNA samples ranged from excellent extraction from GY medium, to wine or vinegar matrices, where the success of amplification depended on the extraction method. Commercial methods are expected to perform better in the PCR reaction (Zimmermann et al., 1998; Smith et al., 2005), but it depends on the method used. Mo-Bio method gave a good signal when no treatment was applied. On the other hand, NucleoSpin method only worked when treated and Wizard method functioned practically in all cases. This confirms previous studies (Zimmermann et al., 1998; Smith et al., 2005) that suggest that the DNA obtained by the Wizard method was the most suitable for PCR amplification. As with NucleoSpin, CTAB method worked better with sample treatment, especially in colored samples. We expected treatments to have a positive effect on the quality of the DNA thanks to the elimination of interfering substances in wine and vinegar that could be coextracted with DNA and could affect PCR (such as polysaccharides, proteins and polyphenols) (Holden et al., 2003). With some methods the results were contradictory (especially Mo-Bio). This could be because this method was developed with a new humic substance/brown color removal procedure that effectively removes PCR inhibitors from even the most difficult soil types. These treatments therefore seemed to be unnecessary and even reactions between NaCl or PVP and the kit's reagents could reduce efficiency.

### **DNA recovery**

The type of matrix used in the extraction had a highly significant effect on the amount of total and amplifiable DNA. The number of cells in all samples of each strain was always

the same because, after incubation in the matrices, the cells were recounted to ensure their number. The differences between methods and treatments in the amount of DNA recovered should therefore only be due to the different efficiencies of the extraction process.

As expected, Thermal shock method also yielded the lowest DNA recovery. This was reflected in the absence of amplification in most cases. With amplification, however, the recoveries were not the lowest. In any case, amplifications with this method appear to be due more to a random factor than to reproducible extractions. The other four extraction methods tested can be divided into two groups. The first group comprises CTAB and NucleoSpin methods. These gave the best recoveries (over 60%), though treatment with PVP or NaCl was essential. CTAB is a cationic surfactant that is added to solubilize the membranes (Alamäe and Järviste, 1995). CTAB helps to remove capsular polysaccharides (Spitzer and Spitzer, 1992) and precipitate the DNA (Sibatani, 1970). In the case of NucleoSpin method, the lysis buffer that contains chaotropic salts, denaturing agents and detergents together with incubation with proteinase K, seemed more efficient than the lysis protocols used in the other two methods.

The second group comprised Mo-Bio and Wizard methods. These methods needed no treatment for positive 16S rDNA amplification, though recovery was lower. This low DNA recovery in the Mo-Bio protocol had already been observed in samples such as tuber cells (Smith et al., 2005), which indicates that bead-grinding using a vortex mixer is not as effective for AAB cell lysis in vinegar/wine samples as cells grown in lab medium. This unexpectedly low quantification could also be due to interfering substances that could inhibit the PCR reaction by blocking amplification or yielding higher Ct values. Another problem detected with this protocol was the high fluctuation in DNA recovery (over 20% in *Ga. hansenii*), which could lead to over- or underestimation of the amount of DNA. Something similar has been reported for the Wizard resin method (Cankar et al., 2006), though in our case this was only observed for red wine samples without treatment in *A. pasteurianus*. The low recovery with the Wizard method could be linked to a lack of efficiency of the AAB cells lysis or losses such as isopropanol precipitation incurred during the protocol. The low content of DNA extracted from cells grown in culture media in *Ga. hansenii* with the NucleoSpin method could have a similar explanation.

Some samples presented high recovery though no amplification was observed on agarose gel after 16S rRNA gene amplification. This could be due to higher sensitivity and less need for DNA quality in real-time PCR. The short fragment amplification (approx. 50 bp) on which RT-PCR is based could be more effective than the one for the 16S rRNA gene, where a 1450 bp fragment is amplified.

## CONCLUSIONS

In conclusion, nucleic acid extraction is often a compromise between yield and purity. Methods yielding high DNA concentrations often contain impurities that may hinder the analysis. Methods yielding a highly purified DNA, on the other hand, often do so at the expense of yield (Zimmermann et al., 1998). In this study the best methods were CTAB and NucleoSpin: both had good equilibrium between amplification and recovery in all matrices studied when the samples were treated with PVP or NaCl. Specifically, CTAB method seemed to be the best method for wines both in quality and yield, while NucleoSpin was better for vinegar, although DNA recoveries were very similar to CTAB method. The improvement due to the previous treatments (NaCl or PVP) was critical for obtaining a good signal in the amplification of the 16S rRNA gene and significantly increasing the amount of DNA extracted. Other interesting criteria for choosing a DNA extraction method are the cost and time needed. The CTAB method is clearly less expensive than commercial kits but it is more time-consuming and more labor intensive. They may both be good methods for extracting DNA from AAB in wine and vinegar samples. As far as we know, this is the first time that an exhaustive study has been performed to test the more suitable methods for the extraction of AAB DNA from common matrices as wine and vinegars. Anyway, although the DNA recoveries obtained in this study are quite good, especially in wine, more studies should center on improving recoveries in vinegar samples, probably by optimizing the washing and lysis steps during the extraction protocol.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for financial assistance from the Spanish Government (Project AGL 2004–07494–C02-02/ALI) and from the European Commission (Project WINEGAR, Cooperative Research under the Sixth Framework Programme of the European Community, 2005–2007). We also thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.

## REFERENCES

Abriouel, H., Omar, N.B., López R.L. Martínez-Cañamero, M., Keleke, S., Gálvez, A., 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *dégué* by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111, 228-233.

Alamäe, T., Järviste, A., 1995. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study. *Journal of Microbiological Methods* 22, 193-205.

Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., Enenkel, A., 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology* 97, 133-145.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds). 1992. In: *Short protocols in molecular biology*. Jonh Willey & Sons Inc, London.

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I., 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* 41, 1160-1164.

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., Gruden, K., 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR- effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6, 37-52.

Cook, K.L., Britt, J.S., 2007. Optimization of methods for detecting *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 69, 154-160.

Demeke, T., Adams, R.P., 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* 12, 332-334.

Do, N., Adams, R.P., 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques* 10, 162-164.

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, K.J., 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.

Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101-117.

Giacomazzi, S., Lerol, F., Joffraud, J.J., 2005. Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1230-1238.

Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19-34.

Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 8, 251-260.



González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology* 106,209-212.

Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-87.

Holden, M.J., Blasic, J.R., Bussjaeger, L., Kao, C., Shokere, L.A., Kendall, D.C., Freese, L., Jenkins, G.R., 2003. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 2468-2474.

McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D., Kjelleberg, S., 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology* 25, 1-9.

Mesa, M.M., Macías, M., Cantero, D., Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescence filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal of Fluorescence* 13, 261-265.

Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., Ghiorse, W.C., 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4715-4724.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136-141.

Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.

Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.T., Kere, C., Diawara, B., Thonart, P., 2006. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 916-923.

Phister, T.G., Mills, D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430-7434.

Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero, J., 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348-355.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23SrDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Sibatani, A., 1970. Precipitation and counting of minute quantities of labelled nucleic acids as cetytrimethylammonium salt. *Analytical Biochemistry* 22, 279-285.

Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.

Smith, D.S., Maxwell, P.W., De Boer, S.H., 2005. Comparison of several methods for extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 9848-9859.

Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935-940.

Spitzer, E.D., Spitzer, S., 1992. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1094-1097.

Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

Trcek, J., Toyama, H., Czba, J., Misicwicz, A., Matsushita, K., 2005. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 366-373.

Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.

Yang, Z.H., Xiao, Y., Zeng, G.M., Xy, Z.Y., Liu, Y.S., 2007. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Applied and Microbiology Biotechnology* 4, 918-925.

Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U., 1998. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 207, 81-90

## ***TERCERA PARTE***

# ***SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS DURANTE UN PROCESO DE ACETIFICACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO***

**Monitoring the evolution of acetic acid bacteria species during a  
superficial acetification process using culture-independent  
techniques**

Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. and Torija, M.J.

En preparación para ser enviado a la revista Food Research International



## ABSTRACT

Acetic acid Bacteria (AAB) are considered fastidious microorganisms due to their lack of good cultivability in solid media, especially those originating in vinegar. Thus, culture-independent methods are highly recommended to obtain a good characterization of vinegar microbiota.

Several culture independent methods have been tested in an experimental production of vinegar that used a mixed inoculum of 5 AAB species (*Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus* and *Acetobacter aceti*, *Gluconacetobacter hansenii* and *Gluconacetobacter europaeus*). DGGE-PCR, RFLPs-PCR of 16S rRNA gene and general qPCR and species-specific qPCR with TaqMan-MGB probes were tested. The main species during the acetification was *A. pasteurianus*, the unique species detected with the three methods along all the process. Instead, *G. oxydans* disappeared very fast in the vinegar production and *A. aceti* and *Ga. europaeus* did not survive the starting of the acetification. The most resolutive method was the qPCR with TaqMan-MGB probes that showed to be very sensitive and were able to detect population sizes of  $10^2$  cells/ml.

## INTRODUCTION

Acetic acid bacteria (AAB) are the microorganisms responsible for the production of vinegar due to their ability to oxidize ethanol to acetic acid (Trcek and Teuber, 2002). The AAB involved in vinegar production belong to the genera *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. malorum* and *A. pomorum*), *Gluconobacter* (*G. oxydans*) and *Gluconoacetobacter* (*Ga.europaeus*, *Ga. hansenii*, *Ga. intermedius*, *Ga. oboediens* and *Ga. xylinus*) (Sokollek et al., 1998; Yamada et al., 2000, Du Toit and Lambrechts, 2002; Bartowsky et al., 2003; González et al., 2004; De Vero et al., 2006).

Most of the studies done for the identification of AAB in different niches have been carried out after the culture of these microorganisms in different solid media (Nanda et al., 2001; Du Toit and Lambrechts, 2002; Gonzalez et al., 2004, 2005; Du Toit et al., 2005; Gullo et al., 2006, Haruta et al., 2006; Camu et al., 2007; Prieto et al., 2007; Camu et al., 2008). But the limitations of culture-dependent methods are (i) the time required and (ii) the low recovery of AAB when these bacteria were isolated from high ethanol and/or acetic acid sources such as wine and vinegar (Entani et al., 1985, Sievers, et al., 1992, Gullo et al., 2006). This low recovery has been associated to a viable but non-culturable (VBNC) cell status (Fleet, 1999; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Giraffa and Neviani, 2001). All these difficulties encountered for the isolation and growth of AAB on solid media are the main responsible for the low level of knowledge in the microbiology of the acetification process. Therefore, to overcome these disadvantages, a good alternative could be the study of AAB using techniques that do not require microorganisms isolation. In fact, application of culture-independent molecular techniques to monitor the microbial successions in various food and beverage fermentations have revealed microbial constituents and microbial interactions not witnessed by previous plating analyses (Giraffa and Neviani., 2001).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE-PCR) and Real-Time-PCR (qPCR) are two of the most widely techniques used for independent-culture microbial analysis. DGGE-PCR has been successfully employed for the analysis of AAB in wine and vinegar samples (De Vero et al., 2006, Andorrà et al., 2008, Ilabaca et al., 2008) while qPCR is a fast, sensitive and accurate tool for the detection and enumeration of microorganisms. Recently, a protocol for the enumeration of total AAB cells (González et al., 2006) and for the



*Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter hansenii* and *Gluconacetobacter europaeus* cell quantification (Torija et al., 2009) have been developed using the qPCR. The latter is based on the use of TaqMan-MGB probes that enables discrimination even with just one mismatch (Alonso et al., 2007), which it is crucial when working with very similar sequences as it is the case of 16S rRNA gene of AAB.

One of the fastest techniques for the identification of AAB species is the RFLPs-PCR 16S rRNA gene (Ruiz et al., 2000). Although its application in similar studies have been carried out after cultivation (Gonzalez et al., 2004, 2005; Prieto et al., 2007), it is also possible to use this technique as culture-independent method. In this case, DNA directly isolated from samples is amplified and the mixture of amplicons may be digested with different restriction enzymes (Ilabaca et al., 2008; Jara et al., 2008).

Therefore, the aim of this work was to compare the capacity of different culture-independent methods for the identification and monitoring of the AAB species during an acetification process. For this purpose, a mixed inoculum was prepared with 5 AAB species, which have been found in vinegar (*A. pasteurianus*, *A. aceti*, *G. oxydans*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus*) and these bacteria were monitored throughout the process by RFLPs-PCR 16S rRNA gene, DGGE-PCR and qPCR with SybrGreen and TaqMan-MGB probes. At the same time, the latter technique enables us to quantify the different AAB species to find out which is their relative abundance in a traditional wine vinegar acetification.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reference bacterial strains**

Four AAB reference strains were employed: *Acetobacter pasteurianus* DSMZ 3509<sup>T</sup>, *Acetobacter aceti* DMSZ 3508<sup>T</sup>, *Gluconacetobacter hansenii* DSMZ 5602<sup>T</sup>, *Gluconobacter oxydans* DSMZ 7145<sup>T</sup> and the strain DSMZ 2004 reclassified as *Gluconacetobacter europaeus* in a previous study (Torija et al., 2009) and used here as *Ga. europaeus* reference strain. These strains were grown in 10 ml of GY media (1% yeast extract, 1% glucose, w/v) for 3-5 days.

### **Starter production**

A pure starter (or vinegar mother) was produced for each reference strain. The initial media was a red wine diluted to have an alcoholic degree around 10% (v/v) and with an acidity of 0,3% (w/v) . The initial population of each AAB was  $10^8$  cells/ml. To have enough starter volume, additions of diluted wine were done before the AAB exhaust the ethanol. The final volume of starters was 1 liter. Daily, the production of acetic acid, the consumption of ethanol and the total AAB population were measured.

### **Vinegar production**

For the production of vinegar, a mixed culture starter with the five species was prepared. For a final volume of 7 liters, the adequate volume of a starter to provide  $10^6$  cell/ml of each AAB species starter was inoculated, adding up to an initial inoculum of  $5 \times 10^6$  cell/ml. The acetification was carried out in a 10-litre oak barrel, filled up with a volume of 7 litres. The acetification process was finished in 65 days, analyzing daily ethanol and acetic acid concentration and AAB population. Samples were taken at different moments during the acetification process to analyse the species distribution: 0, 3, 21, 35, 49 and 65 days.

### **DNA extraction**

DNA was extracted from 1 ml of sample during the starter production and 10 ml during the acetification process. It was performed using the CTAB protocol (Ausubel et al., 1992) with two previous washings with EDTA-PVP 2% as described Jara et al. (2008).

### **AAB enumeration**

Viable and total cells of AAB were counted using the LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit with an epifluorescence microscope Leica DM 4000 B-M (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Daily, 100  $\mu$ l of sample was ten times diluted in EDTA-PVP 2% and after treatment with kit fluorescent stains, cells were recounted in a Neubauer rhodium coated counting chamber with 0.02 mm depth. The viable cell counts were performed by counting green cells and the number of non-viable by red fluorescent cells.

### **RFLPs-PCR 16S rRNA analysis**

We amplified the 16S rRNA gene from DNA directly isolated from vinegar samples according to the method described by Ruiz et al., (2000). The primers used are listed in Table 1. The reactions were carried out in Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster city, USA). In all cases, amplified DNA was detected by electrophoresis on a 1.0% (w/v) agarose gel in TBE buffer and stained with ethidium bromide. The PCR product was digested with two enzymes: *TaqI* and *BccI* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in order to discriminate between AAB species. The restriction fragments generated were detected by 3% agarose electrophoresis gel, stained with ethidium bromide and photographed. Lengths of restriction fragments were assigned by comparison with 100 bp DNA ladder (Gibco-BRL, Eggenstein, Germany).

### **DGGE-PCR analysis**

The conditions and the primers (Table 1) used for the amplification of a region of 16S rRNA gene were the ones described by López et al. (2003). The reactions were carried out in Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

DGGE-PCR analysis was carried out on the code Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules, CA). Electrophoresis was performed in 0.75-mm polyacrylamide gel (8% (w/v) acrylamide-bisacrylamide 37.5:1) containing a 30–60% urea-formamide denaturing gradient (100% corresponds to 7M urea and 40% (v/v) formamide), increasing in the electrophoretic run direction. The gel was subjected to a constant voltage of 150V for 4 h at 60°C in TAE Buffer 1x (40mM Tris base, 20mM Acetic acid glacial, 1mM EDTA 0.5M, pH 8.0 and dH<sub>2</sub>O). After electrophoresis, the DGGE gels were stained in 1 x TAE solution containing ethidium bromide for 15 min and photographed.

The DNA fragments from the PCR-DGGE gels were excised and purified according to Omar and Ampe (2000). Each excised band was then transferred into 50 µl of sterile water and incubated overnight at 4°C to allow diffusion of the DNA. One microlitre of the eluted DNA was used for reamplification with primers without the GC clamp. The PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc. facilities (Seoul, South Korea) using an ABI3730 XL automatic DNA sequencer. The alignment with reference sequences was done

using Sequence Match software from the Ribosomal Database Project II (RDP II) (Cole et al., 2007).

Table 1. Primers used for the different assays carried out in this study

Technique	Microbial Group	Primer	Sequence 5'-3'	Reference
RFLPs-PCR 16S rRNA	AAB	Aceti I	5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3'	Ruiz et al., 2000
		Aceti IV	5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3'	Ruiz et al., 2000
PCR-DGGE	AAB	WBAC1 <sup>GC*</sup>	5'-GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAGA-3'	López et al., 2003
		WBAC2	5'-CCCGGGAACGTATTCACCGCG-3'	López et al., 2003
RT-PCR	Total AAB	QA1F	5'-TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3'	González et al., 2006
		QA2R	5'-TACACACGTGCTACAATGGCG-3'	González et al., 2006
	<i>A. pasteurianus</i>	PASTEU-F	5'-TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3'	Torija et al., 2009
		PASTEU-R	5'-TCGAGTTGCAGAGTGCAATCC-3'	Torija et al., 2009
	<i>A. aceti</i>	ACETI-F	5'-TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA-3'	Torija et al., 2009
		ACETI-R	5'-GCGGGAAATATCCATCTCTGAA-3'	Torija et al., 2009
	<i>Ga. hansenii</i>	HANSEN-F	5'-GTCCACGTTGTAAACGATGTGT-3'	Torija et al., 2009
		HANSEN-R	5'-TGTGCTTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija et al., 2009
	<i>Ga. europaeus</i>	EUR-F	5'-GGGTAAAGTCCCGCAACGA-3'	Torija et al., 2009
		EUR-R	5'-ACCTTCCTCCGGCTTGTC-3'	Torija et al., 2009
	<i>G. oxydans</i>	OXYD-F	5'-CCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGT-3'	Torija et al., 2009
		OXYD-R	5'-CCAGGGTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija et al., 2009
Pre-PCR	<i>A. pasteurianus</i>	Apa-R	5'-CCCATAGGAACCGGCAGTCT-3'	Torija et al., 2009
	<i>A. aceti</i>	AAc-R	5'-GCCGATTGCTCAGCTCATG-3'	Torija et al., 2009
	<i>Ga. hansenii</i>	ITS-GAH	5'-CCACGAGAAGACAGTTCCTTGCT-3'	Torija et al., 2009
	<i>Ga. europaeus</i>	ITS-GAE	5-CAGTCCAGTTACCCAGACCATCCTC-3'	Torija et al., 2009
	<i>G. oxydans</i>	GO-R	5'-GTCATCCAACCTTCGTGGAGACA-3'	Torija et al., 2009

\* GC-rich sequence (5'-GCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCC-3').

## Real-Time PCR (qPCR)

### *Total AAB enumeration*

To quantify the total number of AAB, we followed the protocol proposed by González et al. (2006). The primers used are listed in Table 1. The amplification reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 5 µl of DNA, 1 x SYBR Green universal PCR master mix (Applied Biosystems) and 5 µM of each primer. All analyses were performed in triplicate on an ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems). The  $C_T$  was determined automatically by the instrument.

A standard curve was constructed by plotting the cycle threshold ( $C_T$ ) values of the qPCR performed on a ten-fold dilution series of DNA extracted from  $10^8$  cells ml<sup>-1</sup> of *A. pasteurianus* against the log input cells ml<sup>-1</sup>. Any species could be used to construct the standard curve for AAB quantification since Gonzalez et al. (2006) showed curves practically identical with all the AAB species tested.

### *AAB species enumeration*

The protocol described by Torija et al. (2009) to quantify five species of AAB using the qPCR with species-specific TaqMan-MGB probes was applied. The primers and TaqMan-MGB probes used for this assay are listed in Table 1 and 2, respectively. The amplification reactions were carried out in a total volume of 25 µL. The PCR mixture was prepared with 1 x Taqman Universal Master Mix kit (Applied Biosystems), 100 nM concentration of each primer, 300 nM of each probe, and 5 µL of extracted DNA. The conditions of PCR amplification were: an initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturing at 95°C for 15 s, and annealing at 62°C for 1 min. All analyses were performed in triplicate on an ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems). The  $C_T$  was determined automatically by the instrument. Standard curves were created using a 10-fold serially diluted genomic DNA extracted from  $10^8$  cells ml<sup>-1</sup> of each species.

Table 2. TaqMan-MGB probes used in this study

Species	Sequence 5'-3'	Reference
<i>A. pasteurianus</i>	<b>6FAM-TGGTGACACCATGCT-MGB</b>	Torija et al., 2009
<i>A. aceti</i>	<b>VIC-CAGCCTCTCCATACAA-MGB</b>	Torija et al., 2009
<i>Ga. Hansenii</i>	<b>VIC-TGGCCAAGCCATCCA-MGB</b>	Torija et al., 2009
<i>Ga. Europaeus</i>	<b>VIC-TAGTTGCCATCACGTCTG-MGB</b>	Torija et al., 2009
<i>G. oxydans</i>	<b>6FAM-TGGCTCGATACTGAC-MGB</b>	Torija et al., 2009

### Previous PCR (pre-PCR) assay

For the quantification of minor species in real samples, a pre-PCR was needed (Torija et al., 2009). The forward primers were the same as in qPCR and the reverse primers are listed in Table 1. The optimized PCR mixture (50  $\mu$ L) contained a 0.3  $\mu$ M concentration of the specific primers, 200  $\mu$ M of each of the four dNTPs (Roche Diagnostics GmbH), 1 $\times$ PCR reaction buffer (Ecogen, Spain), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U EcoTaq DNA Polymerase (Ecogen) and 5  $\mu$ L of DNA template. The amplification profile was 1 cycle at 94°C for 5 min and 15 cycles at 94°C for 15 s and 62°C for 30 s. The reactions were performed in a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems).

## RESULTS

### Starter preparation

During the starter preparation, oxidation of ethanol to acetic acid by all AAB species was expected. However, only two of them (*A. pasteurianus* and *Ga. hansenii*) produced more than 5% of acetic acid. On the other hand, *Ga. europaeus* consumed small quantities of ethanol and *G. oxydans* and *A. aceti* did not acetify at all (Table 3).

Regarding to the total population of each species in the final point of the starter preparation, this is to say, just before preparing the inoculum for the acetification process, two (*Ga. europaeus* and *G. oxydans*) of the 3 species that presented lower efficiency in the acetic acid production, showed a decrease in the total population. Furthermore, the viability of these species was considerably lower, especially in *G. oxydans* (Table 3).

Table 3. Total population, viability, acetic acid production and final ethanol concentration of the different starters in the moment of inoculum preparation for the acetification process.

Species	cell/ml	Viability (%)	Acidity (g/l)	Ethanol (g/l)
<i>A. pasteurianus</i>	2,10E+08	88,1	57	31.6
<i>A. aceti</i>	1,80E+08	88,9	6	67.1
<i>Ga. hansenii</i>	1,00E+08	90,0	51	39.5
<i>Ga. europaeus</i>	3,00E+07	66,7	15	60.8
<i>G. oxydans</i>	8,00E+07	37,5	6	69.5

### Acetification process

These individual starters were used for the preparation of the acetification inoculum which should contain the same initial population for all the species tested ( $10^6$  cell/ml).

After inoculation, the acetification was monitored by total acidity and ethanol content. At the beginning, acidity was around 1% (w/v) and ethanol content was 11 % (v/v). The final point of the acetification was considered when the vinegar reached 6% (w/v) of acetic acid. This process finished in 65 days and the final ethanol content was 3.2 % (v/v). Six samples were taken along the acetification (0, 3, 21, 35, 49 and 65 days) to analyse the evolution of AAB species. This study was carried out by different independent-culture techniques: RFLPs-PCR 16S rRNA gene, DGGE-PCR and qPCR.

### RFLPs-PCR 16S rRNA analysis

First of all, each starter was analysed by RFLPs-PCR 16S rRNA gene to confirm the species and to rule out the possibility of cross-contamination between species. In all cases, only the species inoculated was detected.

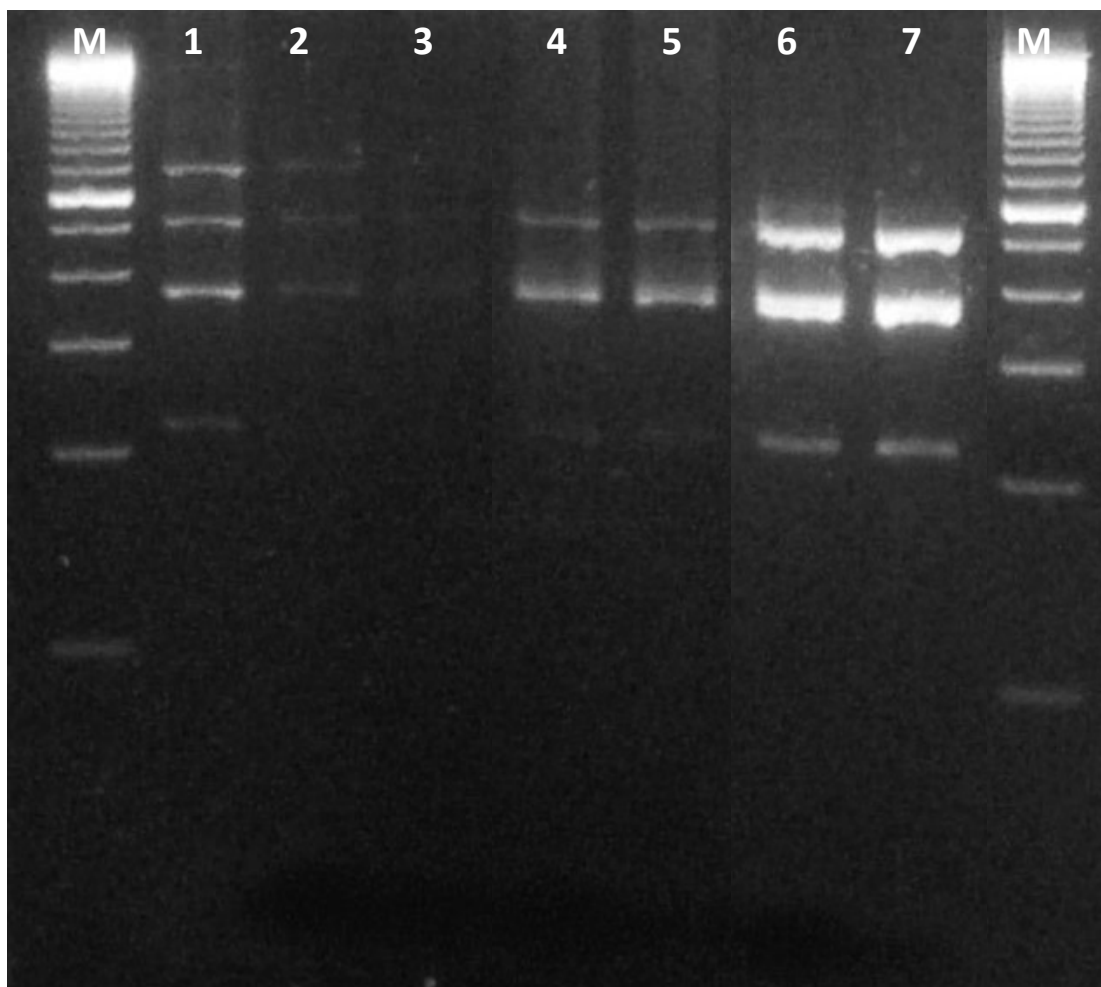


Fig. 1. 16S rRNA gene restriction profiles of the AAB species along the acetification process. Lanes: M: 100 bp DNA ladder (Gibco-BRL); 1: Inoculum; 2: day 0; 3: day 3; 4: day 21; 5: day 35; 6: day 49; 7: day 65

In the initial point of the acetification process (day 0), the profile obtained by *TaqI* showed the characteristic bands of 4 of the 5 species, except the ones for *G. oxydans* (Figure 1). It is important to remark that the characteristic 850-bp band of *A. aceti* was very faint in the gel. The species of *Ga. hansenii* and *Ga. europaeus* have the same profile with this enzyme, but a digestion with *BccI* confirmed the presence of both species (data not shown). However, from day 21, the only species detected was *A. pasteurianus*. Moreover, a significant increase in the band intensity of *A. pasteurianus* profile was observed from day 35, and especially from day 49.



### **DGGE-PCR analysis**

Preliminarily the DGGE profiles of the reference strains of the 5 species were compared. *A. pasteurianus* and *A. aceti* species showed a common profile while *Ga. hansenii* and *Ga. europaeus* showed a similar band migration.

In all the samples analysed we only detected a band which migrated to the same position that the pattern of *A. pasteurianus/A. aceti* (data not shown). To confirm the attribution of these bands to their respective species, the same region of 16S rRNA amplified in the DGGE-PCR technique was sequenced. In all cases, the sequence was identified as *A. pasteurianus*. In the samples from day 0 and 3, a very faint band was observed which presented an electrophoretic mobility similar to those of *Ga. europaeus* or *Ga. hansenii*, confirming results obtained by RFLPs-PCR 16S rRNA (data not shown). This band was not possible to be sequenced due to its low intensity in the gel.

### **AAB enumeration from acetification process**

During the acetification process, total and viable cells were recounted by epifluorescent techniques. The total AAB population presented a 100 fold increase, from  $10^6$  to  $10^8$  cells/ml along the 65 days of acetification with a high viability, especially at the last stages of the acetification (over 95%) (Table 4).

### **Total AAB enumeration**

Total population was also enumerated by SybrGreen<sup>®</sup> qPCR. The initial population obtained by this technique coincided with the inoculated one ( $10^6$  cells/ml). From day 21, a growth in the AAB population was observed, achieving a maximal population between days 35 and 49 ( $10^8$  cell/ml). The enumeration data obtained with this technique were in general, slightly lower than those obtained by microscope counting, resulting this difference more pronounced in the first stages of the acetification process, especially in day 3 (Table 4).

### **AAB species enumeration**

The acetification process was also monitored by qPCR using TaqMan-MGB probes, obtaining values of total AAB cells practically identical to those by SybrGreen<sup>®</sup> qPCR.

In the initial point of the acetification process (day 0), although the total cells value was similar to that obtained by the other two enumeration techniques the density of cells was significantly different between AAB species. Only *A. pasteurianus*, *Ga. hansenii* and *Ga. europaeus* species showed values close to the theoretically inoculated ( $10^6$  cell/ml) and the *A. aceti* species albeit detected, showed an initial population lower than expected (Table 4). The *G. oxydans* species was not detected by its specific probe and it was necessary to use a pre-PCR designed for cases of low numbers cells and mixed populations to be able to quantify ( $3 \cdot 10^2$  cells/ml). The presence of the five AAB species was detected until the day 3 of the acetification process. From this point, the signal of *G. oxydans* and *Ga. europaeus* species disappeared while the one of *A. aceti* was detected only until the day 21, presenting a small increase of its population during this period. *A. pasteurianus* and *Ga. hansenii* species were detected throughout all the process however, their growth was significantly different. *Ga. hansenii* did not grow along the process, presenting from the middle of the process a decrease of one order in its population. On the other hand, the *A. pasteurianus* species showed a clear increase of its population, up to  $10^8$  cells/ml (Table 4).

Table 4. Comparison of AAB cells enumeration between qPCR using SybrGreen and TaqMan-MGB probes and microscope counting.

Day	TaqMan-MGB Probes qPCR					Total TaqMan assay <sup>1</sup>	Sybr Green qPCR	Microscopy	% Viability
	<i>A. pasterianus</i>	<i>Ga. hansenii</i>	<i>Ga. europeaus</i>	<i>A. aceti</i>	<i>G. oxydans</i>				
0	8,09E+05	2,60E+05	6,00E+05	8,58E+03	2,99E+02 <sup>2</sup>	1,68E+06	1,43E+06	4,00E+06	100,0
3	1,00E+06	2,88E+05	3,79E+05	1,06E+04	1,47E+02 <sup>2</sup>	1,68E+06	1,80E+06	9,00E+06	75,0
21	2,17E+07	2,54E+05		6,54E+04		2,20E+07	1,69E+07	6,00E+07	66,7
35	2,19E+08	2,36E+04				2,19E+08	2,32E+08	3,00E+08	96,7
49	1,85E+08	2,75E+04				1,85E+08	2,79E+08	2,10E+08	95,2
65	7,50E+07	1,25E+04				7,50E+07	1,39E+08	2,00E+08	95,0

<sup>1</sup> Total TaqMan-MGB assay is the sum of the five AAB species enumeration using each species-specific probe. <sup>2</sup> Quantification done using a pre-PCR before qPCR

## DISCUSSION

A comparison of different culture-independent methods to monitor the relevance of different AAB species during an acetification process was done. For this purpose, a superficial acetification was carried out with a mixture of 5 AAB species (*A. pasteurianus*, *A. aceti*, *G. oxydans*, *Ga. hansenii* and *Ga. europaeus*) in an oak-barrel. The species used are the main species isolated in wine and vinegar studies (Sokollek et al., 1998; Yamada et al., 2000, Du Toit and Lambrechts, 2002; Bartowsky et al., 2003; González et al., 2004; De Vero et al., 2006). We have applied three techniques (RFLPs-PCR 16S rRNA gene, PCR-DGGE and qPCR), usually employed for the detection and enumeration of microorganisms in ecological studies, during an acetification process. These techniques have been compared to determine their sensibility to monitor the presence of different AAB species. Moreover, qPCR also allowed us to enumerate total and specific AAB during the process. The primers used for qPCR were described in previous studies by our group and showed good specificity for the intended group of microorganisms (Gonzalez et al., 2006; Torija et al., 2009).

Culture-independent techniques are highly sensitive to the DNA quality since different factors such as the complexity of the matrix could interfere in the PCR resolution and efficiency. The more complex is the matrix the more difficult it is to achieve good DNA extraction and PCR reaction (Wilsor, 1997; Ercolini, 2004). In our case, we have used the CTAB protocol (Ausubel et al., 1992) because we demonstrated in a previous study that the DNA recovery of AAB isolated from vinegar is higher using this method (Jara et al., 2008). RFLPs-PCR 16s rRNA analysis is a rapid and reliable technique for the identification of AAB species in wine and vinegar samples (Gonzalez et al., 2004, 2005, Prieto et al., 2007). On the other hand, DGGE-PCR has been used to study microbial diversity and evolution in wine and vinegar (Cocolin et al., 2000; Mills et al., 2002; De Vero et al, 2006; Renouf et al., 2007; Andorrà et al., 2008; Ilabaca et al., 2008). Both techniques can be applied as culture-independent protocols, providing a global vision of sample biodiversity. However, they are not conclusive at species level. So, species attribution or grouping needs to be

confirmed using techniques with a taxonomical value as sequencing. Some problems have been reported about the efficiency of these techniques to detect total diversity, mainly related to a lack of total DNA extraction (Cocolin et al., 2000, Mills et al., 2002). However, the main drawback seems to be that minor species were hardly detected, especially when best adapted species constituted an overwhelming majority (Renouf et al., 2007, Andorrà et al., 2008). In fact, only *A. pasteurianus*, which seemed to be the main species during the process, was detected in all the samples studied. Although the detection limit for AAB species detection was established by Andorrà et al. (2008) around  $10^3$  to  $10^4$  cells/ml, the major presence of *A. pasteurianus* seemed to inhibit the amplification of other minor species. Likewise, in the study of Andorrà et al. (2008), the presence of a large population of *S. cerevisiae* affected the detection threshold of other yeast species which represented 10% of total population. Initial template DNA ratio and template competition may affect the detection of microorganisms present at low abundance in complex microflora (Muyzer et al., 1993; Murray et al., 1996; Temmerman et al., 2004; Zhang et al., 2005) and this could be a possible explanation to our low diversity detection with both techniques.

Rapid and sensitive methods for detecting and enumerating AAB are needed in wine and vinegar industry to control the AAB development. qPCR is a suitable technique that has been successfully applied to detect and quantify several microorganisms associated with food. However, very few studies have been conducted for the detection and enumeration of AAB using qPCR (Gonzalez et al., 2006; Gammon et al., 2006, Andorrà et al., 2008, Torija et al., 2009) and none for the study of AAB evolution during vinegar production. In our case, a comparison between AAB enumeration using qPCR and microscope counting was done. Both techniques presented similar AAB population values along the acetification process and only samples with a lower viability revealed some differences.

Decrease in viability at the first stages of acetification could be accounted for the presence of non-viable cells from the inoculum preparation. In fact, some species, especially *G. oxydans*, presented a high percentage of mortality in the final sample of starter preparation. On the other hand, cell viability increased during the final stages of the process. This could be associated with the overwhelming imposition of *A. pasteurianus* respect to the other

species, which implied that the probability to count in the microscope cells belonging to species different from *A. pasteurianus* was really low and *A. pasteurianus* cells were mostly viable. The prevalence of this species at the last stages of the process was corroborated by the remarkable increase in the band intensity of *A. pasteurianus* 16S rRNA gene restriction profile. Thus, enumeration results supported that qPCR is a rapid and reliable tool for quantifying AAB during the acetification process, both using the total or species-specific protocol.

On the other hand, if the sensibility of this technique to detect the different AAB species in the acetification process was compared with the other techniques tested in this study, qPCR using the specific TaqMan-MGB probes was the one which detected the highest number of species in the initial point. Only *G. oxydans* was not detected. In fact, this species was not detectable by any of the techniques used in this study. To overcome this limitation, we have done a specific pre-PCR which increased the amount of DNA target for the subsequent qPCR, achieving detection of minor microorganisms. After this previous step, *G. oxydans* was detected and quantified by qPCR, confirming that detection problems were due to a very low population during the acetification process. This low detection of some species during all the process, but especially at the first stages of the acetification, was unexpected because we have inoculated similar amount of cells for all AAB species. A possible explanation was a higher mortality in these AAB species. However, we performed the qPCR with total DNA and therefore, we should quantify total cells, alive and dead, yet in our case, species which presented a high number of non-viable cells or species which seemed not to be relevant during acetification, accounted for populations lower than the initial one or even were not detected after the first days of acetification. Therefore, we hypothesised that this lack of detection is related to a deposition of dead cells in the bottom of the barrel since samples were taken in the upper middle of the barrel, where the presence of oxygen is the highest. Thus, we quantified only the cells resting in suspension or in the surface, this is to say, *Ga. hansenii* and especially *A. pasteurianus*. The clear predominance of *A. pasteurianus* along all the process confirmed that this species is the main responsible

of vinegar production by traditional method (Vegas, 2007) similar to what happened in traditional balsamic vinegar (De Vero et al., 2006).

Finally, the high mortality and low relevance during the process shown for some species, especially *G. oxydans* and *A. aceti* may be explained by a lack of adaptation to the acetification conditions. This could be expected for *G. oxydans* which presents an important intolerance to ethanol (Joyeux et al., 1984a) and a preference for glucose as carbon source. However, several studies have reported the ubiquitous presence of *A. aceti* in wine samples and the major responsible of the spoilage of wine by acetic acid formation (Joyeux et al., 1984b; Du toit and Lambrechts, 2002; González et al., 2004; 2005). It is possible that this species is able to produce a few grams per litre of acetic acid in the wine but it is not resistant to higher concentrations. Surprisingly enough it is also the case of *Ga. europaeus* because this species is considered one of the main actors together with *A. pasteurianus* in the vinegar processes (Trcek et al., 2005). However, it was under-represented in the present study. A possible explanation could be that this species is widespread in submerged acetifications and probably it is well-adapted for a highly oxidative environment with high concentration of oxygen. In the traditional vinegar production oxygen availability is restricted to the surface and, therefore, this concentration is much lower than in the submerged processes.

In conclusion, the three culture-independent techniques used in this study allow us to monitor the main species during a superficial acetification process. However, qPCR is the most suitable because it can provide AAB quantification and identification at the same time if the TaqMan-MGB protocol designed by our group is employed. Anyway, the application of these independent-culture techniques presented different objectives. Although DGGE-PCR is considered a technique that allows a global vision, in our hands, it showed to be very limited. RFLPs-PCR 16S rRNA gene could be used for the determination of the major species. However, the presence of minor species (<10%) will be overlooked. On the other hand, qPCR provided a detection and enumeration of specific microorganisms, only the ones that hybridize with the specific probe or set of primers. In further studies, application of this technique to the RNA analysis to be able to distinguish between dead and alive cells

should be interesting, as well as to study the percentage of cells deposition during the acetification process.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful for financial assistance from the Spanish Government (Project AGL2007-66417-C02-02) and the European Commission (Project WINEGAR, Cooperative Research under the Sixth Framework Programme of the European Community, 2005-2007). We thank the Language Service of the Rovira i Virgili University for revising the manuscript.



## REFERENCES

Alonso, R., Mateo, E., Cisterna, R., 2007. Detection of *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae* by Real-time PCR and Taqman-MGB probes. *Journal of Microbiological Methods* 69(1), 214-217.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*. 25, 849-856.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. In: *Short protocols in molecular biology*. Jonh Willey & Sons Inc (ed.), London.

Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, P.A., Henschke., 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 36(5), 307-314.

Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst., L., 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 73(6), 1809-1824.

Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K., De Vuyst., L., 2008. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 86-98.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189, 81-87.

Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J. Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* 35, D169-D172

De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* 23, 809-813.

Du Toit, W.J., and Lambrechts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74(1-2), 57-64.

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *The Journal of Applied Physiology* 98, 862-871.

Entani, E., Ohmori, O., Masai, H., Suzuki, K., 1985. *Acetobacter polioxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475-490.

Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101-117.

Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.

Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., Middleton, A.M., 2006. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in a electrolyte replacement drink. *Letters Applied of Microbiology* 44, 262-267.

Giraffa, G., and Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*.67, 19-34.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during a wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102(3), 295-304

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254(1), 123-128.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology* 106(2), 209-212.

Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot

fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-87.102, 295-304.

Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A., 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.

Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Torija, M.J., Mas A., 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods *International Journal of Food Microbiology* 128, 336–341

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreu-Gayon, P., 1984a. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreu-Gayon, P., 1984b. Metabolism of acetic acid bacteria in grape must: consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Sciences des Aliments* 4, 247-255.

López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Philster, T., Marshall, M., Vander-Gheynst, J., Mills, D., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801–6807.

Millet, V., and Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136-141.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4884–4893.

Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2676–2680.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.

Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosusu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.

Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero J., 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348-355.

Omar, N.B., and Ampe, F., 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3664–3673.

Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 41, 51–61.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23SrDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Sievers, M., Sellmar, S., Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.

Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935-940.

Temmerman, R., Huys, G., Swings, J., 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* 15, 348-359.

Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2009. Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (submitted).

Trcek, J. and Teuber, M., 2002. Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 208(1), 69-75.

Trcek, J., Toyama, H., Czba, J., Misiwicz, A., Matsushita, K., 2005. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 366-373.

Vegas, C., 2007. Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas en la producción de vinagre por el método tradicional, Diploma de Estudios Avanzados (DEA), URV.

Wilsor, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3741–3751.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 823-829.

Zhang, Li., Danon, S., Grehan, M., Lee, A., Mitchell, H., 2005. Template DNA ratio can affect detection by genus-specific PCR-denaturing gradient gel electrophoresis of bacteria present at low abundance in mixed populations. *Helicobacter* 10, 80–82.





## ***DISCUSIÓN GENERAL***



En los últimos años, debido al uso de técnicas moleculares, nuestro conocimiento de la biodiversidad en comunidades microbianas complejas ha aumentado considerablemente. Las técnicas moleculares han resultado herramientas excepcionales para la detección, identificación y caracterización de los microorganismos implicados en diferentes ecosistemas ambientales y de alimentos.

En general no hay muchos antecedentes del comportamiento de las bacterias acéticas (BA) en ambientes naturales o industriales. En hábitats naturales, como en viñedos, se sabe que estas bacterias coexisten con otros microorganismos (levaduras, hongos y otras bacterias). De todas maneras, en el área enológica, las BA han recibido escasa atención, sobretodo si lo comparamos con los estudios realizados en levaduras o bacterias lácticas. De hecho, la principal preocupación de los enólogos es evitar su proliferación para controlar la producción de ácido acético y otros metabolitos desagradables, problema común en todas las bodegas del mundo. Por tanto, pocos estudios han estado enfocados en el conocimiento de qué especies y cepas eran las responsables de estas alteraciones (Joyeux et al., 1984; Poblet et al., 2000; Du Toit y Lambrechts, 2002; González et al., 2004, 2005; Du Toit et al., 2005). Por el contrario, las BA tienen un gran interés biotecnológico en la elaboración de vinagres, ya que estos microorganismos son los responsables del proceso de acetificación.

Por tanto, uno de los objetivos principales de esta tesis era aumentar los conocimientos sobre las BA y los procesos en los cuales están implicadas. Para ello, lo primero es conocer la diversidad de especies de BA presentes en diferentes hábitats naturales mediante la realización de estudios ecológicos.

Actualmente, la elaboración de vinos es una actividad de gran interés económico en Chile que abarca principalmente la parte central del país. De forma bastante generalizada, las vinificaciones se realizan mediante la inoculación de levaduras comerciales provenientes de diferentes orígenes. Esta estrategia que pretende asegurar la correcta realización de la fermentación así como la obtención de vinos de calidad más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Ribéreau-Gayon, 1985; Giudici y Zambonelli, 1992; Fleet y Heard, 1993), tiene como principal inconveniente la pérdida de tipicidad y originalidad del producto (Mateo et al., 1991; Fugelsang, 1996; Heard, 1999). En el caso concreto de Chile,

su aislamiento y disposición geográfica hace posible que puedan existir cepas autóctonas chilenas con propiedades tecnológicas interesantes que pudieran ser idóneas para su utilización como inóculos en futuros productos, aglutinando así, las características beneficiosas de la inoculación pero manteniendo la tipicidad de la zona. Este razonamiento tan claramente arraigado en la selección de starters de levaduras para la vinificación y ya realizado con éxito en muchas zonas vitivinícolas (Frezier y Dubourdieu; 1992; Querol et al., 1992; Versavaud et al., 1995; Sabaté et al., 1998; Torija et al., 2001; 2002; Beltran et al., 2002), puede ser igualmente válido para las BA en la elaboración de vinagres. El problema con el que nos encontramos en el caso de las BA es la falta de estudios ecológicos y por tanto, la falta de una colección de cepas y especies a partir de la cual poder desarrollar estrategias para la selección de “starters” o en el caso enológico, para controlar su desarrollo. Por tanto, el primer objetivo de la tesis era la realización de un estudio ecológico en viñedos chilenos a lo largo de todo el país.

Para la realización de estudios ecológicos es necesario disponer de métodos rápidos y fiables para la identificación de microorganismos, por el gran número de muestras que se han de procesar. Para la identificación de BA en este estudio, se utilizaron dos métodos de identificación puestos a punto por nuestro grupo de investigación, concretamente el análisis de restricción del amplificado del gen 16S rRNA (RFLPs-PCR 16S rRNA; Ruiz et al., 2000) y el análisis de restricción del amplificado del espacio intergénico entre los genes 16S y 23S rRNA (RFLPs-PCR ITS 16S-23S rRNA; Ruiz et al., 2000; Trecek y Teuber, 2002). Estas técnicas nos permitieron hacer una primera clasificación de los aislados, aunque el hecho de utilizar un número limitado de enzimas de restricción limitaba bastante su poder discriminante. Además al tratarse de técnicas que no tienen valor taxonómico, para la identificación definitiva de los aislados, estas técnicas fueron complementadas con la secuenciación del gen 16S.

Las especies de BA aisladas e identificadas en este estudio fueron dos *Gluconobacter oxydans* y *Acetobacter cerevisiae* (100% identidad en la secuenciación). Uno de los resultados más interesantes del estudio fue la mínima coexistencia de las dos especies de BA aisladas y el hecho de que su distribución fuera dependiente de la latitud. La especie *A.*

*cerevisiae* se encontró en las zonas vitivinícolas del Norte mientras que *G. oxydans* se encontró en las zonas del Sur, presentado únicamente coexistencia en la zona de Curicó que parece que haga de barrera entre las dos especies. La detección de *G. oxydans* en uvas es habitual en prácticamente todos los estudios realizados en uva (Joyeux et al., 1984; Barbe et al., 2001; Du Toit y Lambrechts, 2002; González et al., 2005), sobretodo cuando éstas se encuentran en perfecto estado sanitario. De hecho, *G. oxydans* se trata de una especie que prefiere los azúcares como fuente de carbono en lugar del etanol, por lo que su presencia durante la acetificación suele ser prácticamente nula. Más sorprendente es la presencia de *Acetobacter cerevisiae* en vez de *Acetobacter aceti* o *Acetobacter pasteurianus* (Barbe et al., 2001; Du Toit y Lambrechts, 2002; González et al., 2004). *Acetobacter cerevisiae* ha sido descrita recientemente como una especie nueva, ya que anteriormente estaba incluida dentro del grupo de *A. pasteurianus* (Cleenwerck et al., 2002). Esta reciente descripción impide su detección como tal en estudios anteriores, por tanto, este estudio es el primero en el que se ha aislado *A. cerevisiae* en uva. Las cepas hasta ahora disponibles de esta especie en la diferentes colecciones tienen su origen principalmente en ambientes cerveceros (Cleenwerck et al., 2002). De todas maneras, por las condiciones de aislamiento de los valles chilenos y la falta de detección de especies más habituales en uva como *A. pasteurianus*, *A. aceti* o *Ga. hansenii* (Joyeux et al., 1984; González et al., 2005) no es descartable que esta especie pueda ser característica de esta zona. Por tanto, el estudio del potencial biotecnológico de las cepas de esta especie aisladas durante este estudio ecológico puede ser interesante para su posible aplicación como inóculos autóctonos en la elaboración de vinagres chilenos.

Uno de los principales problemas que nos encontramos durante este estudio y de forma general, en cualquier estudio realizado con BA es su bajo crecimiento o recuperación en medios de cultivo sólidos. Esto hace que los recuentos realizados con el microscopio sean muy superiores a la recuperación en placa (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006; Ilabaca et al., 2008; Torija et al., 2009). Estos problemas de cultivabilidad en placa son especialmente importantes cuando las BA proceden de medios con condiciones más restrictivas, p.ej. medios ricos en etanol o ácido acético como

el vino o el vinagre (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998a; Millet y Lonvaud-Funel, 2000; Trcek, 2005) y se asocian tanto a la formación de agregados por parte de las BA como por la entradas de sus células en un estado conocido como viable pero no cultivable (VBNC). Se ha descrito que la formación de agregados por parte de los microorganismos complica mucho los métodos de enumeración de células basados en la cultivabilidad (Janssen et al., 2002; Ilabaca et al., 2008). De hecho, en el caso concreto de las BA, debido a su metabolismo aerobio estricto, éstas tienden a permanecer en la superficie del líquido para poder disponer del oxígeno necesario para su metabolismo. La forma más común para mantenerse en la superficie es formando agregados que pueden llegar a producir un biofilm, lo cual dificulta enormemente la recuperación de colonias aisladas en placa. Por otro lado, se ha observado que las células cuando se encuentran en medios extremos entran en estado VBNC. En este estado, las células dejan de ser cultivables en medios de cultivo aunque todavía presentan actividad metabólica. Esta actividad hace que sean detectables como viables cuando son analizadas por técnicas de epifluorescencia pero que no seamos capaces de recuperarlas en placa (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006).

Debido a todos estos problemas de recuperación, durante el estudio ecológico se recurrió a la utilización de medios de enriquecimiento para aumentar la biomasa de las BA que se pudieran encontrar en la uva. El problema del preenriquecimiento es que no sabemos si durante esta etapa estamos manteniendo una representación de los microorganismos presentes en el medio original o se está produciendo un enriquecimiento sólo de algunas especies, aquéllas que presentan una mayor habilidad para crecer en el medio de cultivo utilizado (Giocomazzi et al., 2004). Por tanto, una de las necesidades básicas para el estudio de microorganismos en general y de BA en particular, es la de disponer de medios en los cuales puedan crecer de forma adecuada las especies minoritarias, estresada, etc. (Fleet, 1999). En la actualidad, no se disponen de medios idóneos para la recuperación total de BA, siendo los más utilizados los medios Glucosa (GYC) y manitol. En nuestro grupo de investigación, se ha diseñado un medio nuevo, el V50, el cual presenta en su composición etanol como fuente de carbono, para simular el medio vino e así, intentar recuperar especies

que presentan dificultad de crecimiento en otros medios de cultivo. Aunque la recuperación en este medio mejora ligeramente, las diferencias respecto al recuento al microscopio son todavía muy importantes (Quintero et al., 2008).

Por tanto, ante la falta de medios de cultivo idóneos para la recuperación de BA, la alternativa era la utilización de técnicas independientes de cultivo. La correcta aplicación de estas técnicas depende principalmente de una buena extracción del DNA de las BA en las diferentes matrices a estudio (vino y vinagre) tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de los estudios que se han realizado con BA únicamente se han analizado cepas cultivables y por tanto, la extracción de DNA se realizaba a partir de aislados, lo cual facilitaba dicha extracción (Nanda et al., 2001; González et al., 2004; Gullo et al., 2006, Trcek et al., 2005; Haruta et al., 2006; Prieto et al., 2007). De hecho, son muy pocos los estudios donde el DNA se ha aislado directamente de las muestras de vino y vinagre (De Vero et al., 2006; Andorrà et al., 2008; Ilabaca et al., 2008). Por tanto, el primer paso para la aplicación de técnicas independientes de cultivo en el estudio de las BA era la puesta a punto del método de extracción más eficiente para este tipo de muestras.

En el mercado existen multitud de kits para la extracción de DNA de muestras problemáticas, especialmente suelos, compostaje, etc. En nuestro estudio, se eligieron 3 kits comerciales de los más utilizados juntamente con métodos más económicos como el método basado en la utilización del CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; Ausubel et al., 1992) o un método rápido basado en un choque térmico a 95°C. Teniendo en cuenta tanto aspectos cualitativos como cuantitativos los mejores métodos para la extracción del DNA de BA presentes en muestras de vino y vinagre fueron los métodos del CTAB y el kit comercial NucleoSpin, aunque en ambos casos fue necesario realizar unos lavados previos con PVP o NaCl. Estos tratamientos mejoraban la calidad del DNA debido a la eliminación de sustancias presentes de forma natural en vino o vinagre, como polifenoles, polisacáridos, proteínas, que podían coextraerse con el DNA y afectar a la PCR posterior (Phister and Mills, 2003). Otros criterios que también son importantes a la hora de elegir qué método de extracción de DNA se va a utilizar en un determinado estudio, sobretodo si

éste es un estudio de rutina, es el coste y el tiempo que supone por muestra. Entre estos dos métodos, el coste era considerablemente inferior en el método CTAB aunque el tiempo empleado significativamente superior. Por tanto, valorando todos estos criterios, establecimos como método de extracción estándar para vino y vinagres en nuestro laboratorio el método CTAB.

Un dato a tener en cuenta es que el porcentaje de recuperación de DNA en las matrices vino y vinagre nunca será del 100%, ya que en vinos, las recuperaciones máximas obtenidas con los mejores métodos estaban alrededor del 90%, mientras que en vinagres, la recuperación fue inferior (60%). A pesar de esta pérdida significativa de información debida a que no se consiguió una extracción total, ésta es mucho menor que cuando se realizan estudios con cepas cultivables, donde se estima que se aísla solamente entre el 1-5% de todos los microorganismos presentes (Hunter-Cevera, 1998). De hecho, los datos de recuperación de viables en el caso de BA pueden ser incluso inferiores, ya que las diferencias entre los contajes al microscopio y los recuentos en placa pueden alcanzar incluso los 3 o 4 órdenes de magnitud de diferencia (Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006; Torija et al., 2009). Por tanto, la utilización de métodos independientes de cultivo basados en la extracción directa del DNA nos proporcionará mucha más información acerca de la situación real de la muestra.

Una vez decidida la mejor metodología para la extracción de DNA, el siguiente paso era conocer las posibilidades que nos ofrecían los métodos de identificación existentes para mejorar nuestro conocimiento acerca de las BA. Para ello, se comparó la información y utilidad de 3 métodos independientes de cultivo, que se utilizan habitualmente para la detección e identificación de microorganismos, en el seguimiento y monitorización de diferentes especies de BA durante una acetificación por el método tradicional. Concretamente los métodos utilizados fueron: RFLPs-PCR 16S rRNA, Electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE-PCR) y la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (RT-PCR) y para el estudio se preparó un inóculo mixto formado por 5 de las especies más habitualmente aisladas en muestras de vino y vinagre (*A. pasteurianus*, *A. aceti*, *G. oxydans*, *Ga. hanseni* y *Ga. europaeus*)



La técnica de RFLPs-PCR 16S rRNA es una técnica rápida, en la que se pueden procesar una gran cantidad de muestras y que resulta adecuada para distinguir y agrupar microorganismos en base de sus relaciones filogenéticas (Ruiz et al., 2000; Poblet et al., 2000; González et al., 2004; 2005). La técnica de DGGE-PCR, por su parte, ha sido utilizada con éxito para la identificación de BA en muestras de vino (López et al., 2003; Andorrà et al., 2008) o Aceto Balsámico tradicional (De Vero et al., 2006). Ambos métodos nos permiten tener una visión global de la microbiota presente en la muestra, ya que ambas metodología consisten en realizar una amplificación en el gen 16S rRNA, una zona altamente conservada, por lo que los primers no sólo pueden amplificar todas las especies de BA presentes en la muestra, sino también otros microorganismos. Esta es la principal ventaja de la utilización de estas técnicas, mientras que sus principales inconvenientes son la falta de detección de especies minoritarias cuando hay alguna especie muy mayoritaria y que la información que nos proporciona no tiene valor taxonómico y por tanto, debe ser complementada con otras metodologías que si tengan valor taxonómico como la secuenciación o hibridación DNA-DNA. Por tanto, finalmente, la utilización de estas técnicas en nuestro estudio resultó útil para monitorizar únicamente la especie mayoritaria a lo largo del proceso de acetificación.

Por su parte la RT-PCR se trata de un método rápido, altamente sensible y específico para la detección y cuantificación simultánea de microorganismos. En el caso de la BA, pocos son los estudios que han empleado esta técnica (González et al., 2006; Andorrà et al., 2008; Gammon et al., 2006; Torija et al., 2009) Las principales ventajas de esta técnica es la mayor especificidad de la reacción, detectándose el producto en cada ciclo de la reacción, permitiendo, por tanto, el análisis de la cinética de la reacción así como su cuantificación. En este estudio se utilizaron dos sistemas diferentes de detección, para el análisis de las BA totales se utilizó SybrGreen mientras que para la detección de las diferentes especies de BA se utilizaron sondas TaqMan-MGB. La utilización de este tipo de sondas permite una mayor especificidad de la reacción, siendo capaces de discriminar entre secuencias con un único nucleótido de diferencia (Alonso et al., 2007). Esto es importante para ser capaces de detectar de forma independiente especies que están muy próximas, como es el caso de las

especies de BA. Esta gran especificidad, puede ser al mismo tiempo que la principal ventaja de la técnica también su principal inconveniente, ya que con esta técnica sólo detectaremos aquellos microorganismos de los cuales tengamos primers o sondas, unido a su alto coste. De forma que no servirá como técnica de screening en muestras donde desconocemos la microbiota presente sino para hacer estudios más específicos.

Por tanto, la aplicación de estas técnicas al seguimiento de la acetificación en cuestión, nos permitió determinar que la especie mayoritaria y responsable de la acetificación era *A. pasteurianus*. Esta fue la única especie detectada por las 3 técnicas en todas las muestras. La especie *A. pasteurianus* ya ha sido la mayoritaria en otras acetificaciones realizadas por el método superficial, como en el estudio ecológico realizado en dos vinagrerías de España y Francia (Vegas, 2007) o en un estudio similar con Aceto Balsamico Tradizionale (De Vero et al., 2006). Por otra parte, la única técnica que fue capaz de detectar todas las especies inoculadas fue la RT-PCR, aunque en algunos casos las poblaciones fueron muy bajas, lo que puede explicar la falta de detección con las otras técnicas utilizadas, menos sensibles, especialmente la DGGE-PCR. El caso de *G. oxydans* merece una explicación especial porque tampoco fue detectada de forma directa por la RT-PCR, sino que fue necesaria la realización de un paso previo de PCR, con unos primers específicos. Esta pre-PCR consiste en un enriquecimiento de la muestra únicamente en la especie diana, de forma que posteriormente pueda detectarse con la RT-PCR. Este paso es necesario porque en el protocolo de Torija et al (2009), la especificidad de la técnica viene dada únicamente por la sonda, por lo que la detección de especies minoritarias puede verse interferida por la presencia de otras especies que sí son amplificadas por los primers aunque no detectadas (por la falta de hibridación de la sonda).

La única especie, además de, evidentemente *A. pasteurianus* que fue detectada durante todo el proceso por la RT-PCR, fue *Ga. hansenii*, aunque sus poblaciones fueron muy inferiores. Las otras 3 especies solo fueron detectadas en los primeros días de acetificación. La baja importancia de *G. oxydans* y *A. aceti* a lo largo del proceso no resulta sorprendente, debido a que son especies más habituales en vino (Joyeux et al., 1984; Barbe et al., 2001; Du Toit y Lambrechts, 2002; González et al., 2005) que en vinagre. En cambio, más sorprendente

resulta la baja detección y cuantificación de *Ga. europaeus*. Esta especie es considerada junto con *A. pasteurianus* como las principales especies responsables de los procesos de acetificación. De todas maneras, *Ga. europaeus* es una especie que siempre se ha asociado con acetificaciones realizadas por sistemas sumergidos donde las condiciones son extremadamente diferentes a las del sistema tradicional (Sievers et al., 1992, Sokollek et al., 1998b, Trcek et al., 2005). En las acetificaciones sumergidas, además de una presencia constante y abundante de oxígeno, se realizan ciclos de acetificación en los que las condiciones iniciales presentan niveles mucho más elevados de ácido acético (5-6%) (Trcek et al., 2005), lo cual parece favorecer el desarrollo de esta especie.

Las perspectivas futuras de este trabajo es continuar ampliando nuestro conocimiento sobre las BA que todavía es muy limitado. De todas maneras, a pesar de estas limitaciones, creemos que las técnicas independientes de cultivo que se han utilizado en la presente tesis doctoral están destinadas a ser una herramienta fundamental en el conocimiento de este grupo bacteriano. Tal vez en un futuro no muy lejano, la denominación de microorganismos “fastidiosos” no sea más que un recuerdo de un pasado en el que estas bacterias pusieron en jaque a la mayor parte de las técnicas microbiológicas clásicas. El otro punto importante sobre el que se tendría que seguir trabajando es en la recuperación de estas bacterias en medios de laboratorio. Sería interesante ser capaces de desarrollar medios de cultivo más idóneos para la recuperación de las BA, porque se ha de tener en cuenta que aunque la utilización de técnicas independientes de cultivo nos puede permitir una visión de lo que sucede en un proceso a nivel de especie, el aislamiento e identificación de cepas requiere del cultivo para su aislamiento como cepa pura. Por tanto, continúa la necesidad de medios de cultivo sólidos para la caracterización de BA, así como para poder hacer estudios de selección de cepas. También podría resultar interesante la aplicación de la RT-PCR a muestras de RNA para poder cuantificar únicamente las células viables y no las totales.

## BIBLIOGRAFÍA

Alonso, R., Mateo, E., and Cisterna, R., 2007. Detection of *parC* mutations in *Streptococcus pneumoniae* by Real-time PCR and Taqman-MGB probes. *Journal of Microbiological Methods* 69, 214-217.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., and Esteve-Zarzoso, B., 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25, 849-856.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., 1992. In: *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc (ed.), London.

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas I.M., Cantero-Moreno D., Barja, F., and García-García, I., 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry*. 41, 1160-1164.

Barbe, J.C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., and Lonvaud-Funel, A., 2001. Role of botrytized grape microorganisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 90, 34-42.

Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M.T., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., and Mas, A. 2002 Analysis of yeast populations during alcoholic fermentations: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 287-293.

Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., and Swings, J., 2002. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov.

and *Acetobacter malorum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1551-1558

Du Toit, W.J., and Lambrechts, M.G., 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. International Journal of Food Microbiology 74, 57-64.

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., and Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of *Acetobacter pasteurianus* and strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. Journal of Applied Microbiology 98, 862-871.

De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., and Giudici, P., 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. Food Microbiology 23, 809-813.

Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. International Journal of Food Microbiology 50, 101-117.

Fleet, G.H., and Heard, G.M., 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27-54.

Frezier, V., and Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. American Journal Enology and Viticulture 43, 375-380

Fugelsang, K.C., 1996 In: Wine Microbiology. Chapman and Hall, New York, USA

Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., and Middleton, A.M., 2006. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in a electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology* 44, 262-267.

Giacomazzi, S., Lerol, F., and Joffraud, J.J., 2005. Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1230-1238.

Giudici, P., and Zambonelli, C., 1992 Criteri di selezioni dei lieviti per enologia. *Vigne vini* 9, 29-34.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during a wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102, 295-304.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., and Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.

Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., and Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-87.

Heard, G.M., 1999. Novel yeasts in winemaking looking to the future. *Food Australia* 51, 347-352.

Hunter-Cevera, J.C., 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology* 1, 278-285.

Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., and Mas, A., 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology* 126, 245-249.

Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., and Sait, M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2391-2396.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 153-156

López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Philster, T., Marshall, M., Vander-Gheynst, J., and Mills, D., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.

Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T., and Pastor, A., 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to aroma of wines. *International Journal of Food Microbiology* 14, 153-160.

Mesa, M.M, Macías, M., Cantero, D., and Barja, F., 2003. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *Journal Fluorescence* 13, 261-265.

Millet, V., and Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136-141.

Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., and Murooka, Y., 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 986-990.

Phister, T.G., and Mills, D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430-7434.

Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology* 31, 63-67.

Prieto, C., Jara, C., Mas, A., and Romero J., 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115, 348-355.



Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948-2953.

Quintero, Y., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2008. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* (aceptado).

Ribéreau-Gayon, P., 1985. New developments in wine microbiology. *American Journal Enology and Viticulture* 36, 1-10.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23SrDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Sabaté, J., Cano, J., Querol, A., and Guillamón, J.M., 1998 Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentation: analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology* 26, 452-455.

Sievers, M., Sellmar, S., and Teuber, M., 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386-392.

Sokollek, S.J., Hertel, C., and Hammes, W.P., 1998a. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60, 195-206.

Sokollek, S.J., Hertel, C., and Hammes, W.P., 1998b. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935-940.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2002 Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80, 47-53.

Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2009. Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (submitted).

Trcek, J., and Teuber, M., 2002. Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 208, 69-75.

Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

Vegas, C., 2007. Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas en la producción de vinagre por el método tradicional, Diploma de Estudios Avanzados (DEA), URV.

Versavaud, A., Corcoux, P., Poulland, C., Dulau, L., and Hallet, J.N., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3521-3529.

## ***CONCLUSIONES***



- Durante el estudio ecológico de las bacterias acéticas en uvas chilenas, se observó una baja diversidad de especies de BA, encontrándose únicamente 2 especies: *G. oxydans* y *A. cerevisiae*. *G. oxydans* ha sido habitualmente descrita en uvas mientras que *A. cerevisiae* es la primera vez que se describe en uva. En cambio, a nivel de cepa, se encontró una gran diversidad.
- La distribución geográfica de ambas especies mostró una clara separación Norte-Sur, con una sola zona de coexistencia (Lontué, Curicó).
- El aislamiento y recuperación de BA en medios de cultivo sólidos durante el estudio ecológico resultó especialmente difícil, lo que se puede correlacionar tanto con el buen estado sanitario de las uvas, así como con la baja cultivabilidad de las BA en medios de cultivo de laboratorio.
- Las importantes diferencias observadas entre los contajes de BA realizados por microscopia y la recuperación obtenida en placa se debe a la tendencia de estas bacterias a agregarse y a su posible entrada en un estado de viable pero no cultivable (VBNC) sobretodo cuando estas BA proceden de medios restrictivos como el vino o el vinagre. Para solventar estos problemas, es necesario la aplicación de técnicas independientes de cultivo.
- Para la correcta aplicación de técnicas independientes de cultivo es crucial una buena extracción de DNA tanto a nivel de calidad como de cantidad. Los mejores métodos para la extracción de DNA de BA procedentes de vino y vinagre fueron el método CTAB y el kit comercial NucleoSpin. En ambos métodos de extracción, para mejorar el rendimiento de la extracción fue necesario hacer un lavado previo con PVP para eliminar posibles interferencias.

- La aplicación de las técnicas del DGGE-PCR y análisis de restricción de amplificado del gen del 16S rRNA (RFLPs-PCR 16S rRNA) en una acetificación mixta permitieron monitorizar únicamente la especie mayoritaria durante la acetificación, *Acetobacter pasteurianus*. Las especies minoritarias prácticamente no se detectaron.
- La técnica de la PCR cuantitativa (RT-PCR) nos permitió cuantificar las BA de forma rápida y eficiente durante el seguimiento de una acetificación. Los contajes fueron muy similares a los obtenidos por microscopía.
- La PCR cuantitativa utilizando sondas específicas TaqMan-MGB permitió la detección y cuantificación de todas las BA excepto *G. oxydans* durante el proceso de acetificación. Para la detección de *G. oxydans* fue necesaria la realización de una PCR previa para aumentar la cantidad de DNA diana, debido a su baja población. Por tanto, esta técnica nos permitió identificar todas las especies de BA presentes en la acetificación, así como determinar su importancia relativa durante el proceso.
- La especie mayoritaria en las acetificaciones realizadas en este estudio por el método tradicional fue *A. pasteurianus*.

# ***ANEXOS***





## ANEXO I : ZONIFICACION DE VALLES VINÍCOLAS DE CHILE



Fig. 1. Zonificación vinícola de Chile.

Esta zonificación divide al país en cinco grandes regiones vitivinícolas, distribuidas entre los paralelos 30° y 38° latitud sur (Atacama, Coquimbo, Aconcagua, Valle Central y Región Sur) (Costa, 2003). Esta distribución comprende los siguientes valles de norte a sur: valle de Elqui y Limari, Valle de Aconcagua, Valle de Casablanca, Valle de San Antonio, Valle Maipo, Valle Cachapoal, Valle Colchagua, Valle Curicó, Valle Maule, Valle Itata y Valle del Bio-Bio.

### **1. Valle de Elqui y Limari**

Ubicado a 500 kilómetros de Santiago, conforma la frontera norte de las regiones vinícolas de Chile. Aquí las condiciones climáticas para el cultivo de uvas son excelentes: un valle bien ventilado y seco, ya que las precipitaciones anuales llegan sólo a los 130 mm. Esta zona se encuentra en pleno desarrollo, debido principalmente a la industria enológica, ya que desde el año 2003 se está fomentando la producción de vino. Se trata de una zona que es característica por la producción de destilados como el pisco.

### **2. Valle de Aconcagua**

A unos 100 kilómetros al norte de Santiago se encuentra el río Aconcagua, a través del valle central de cordillera a mar. El río Aconcagua nace en la montaña del mismo nombre, la que con casi 7.000 metros de altura es la cima más alta de Los Andes, para luego desembocar en Valparaíso, en el Océano Pacífico. El Valle de Aconcagua ofrece condiciones climáticas ideales para el cultivo de cepas, con días calurosos y noches frescas-húmedas.

Una de las particularidades de este valle, que lo hace irrepetible a nivel mundial, es la combinación climática, de climas frescos y alta luminosidad. La altitud del valle y una oscilación térmica elevada generan en verano un ambiente fresco y en invierno uno relativamente cálido; provocando que en la época de maduración de la uva, el sol llegue directo a los viñedos.

### **3. Valle de Casablanca**

Entre los Andes y la cordillera de la Costa se extiende el fresco Valle de Casablanca, a unos 60 kilómetros de Santiago. La cercanía del mar influye en el clima, lo que se traduce en humedad permanente debido a la niebla matinal. Los suelos son por naturaleza muy arcillosos y ricos en minerales descompuestos, provenientes del derretimiento de la nieve de los Andes.

Estas condiciones son propicias para producir frutas ricas en aroma y color. Los vinos de Casablanca se caracterizan por su frutuosidad exacerbada, no sólo con respecto a otros valles chilenos sino también con otras zonas del mundo, como es el caso del Chardonnay y el Sauvignon Blanc.

### **4. Valle de Maipo**

En las cercanías de la capital Santiago, tiene sus inicios la historia de la producción del vino chileno. Hasta hoy día es esta región vinícola la más conocida de Chile. El clima en el Valle del Maipo es estable, un clima mediterráneo, estaciones bien marcadas y características excepcionales para cultivar la vid, veranos cálidos y secos e inviernos cortos y suaves, que por regla general, no sobrepasan los 450 mm. de precipitaciones anuales. Los días son calurosos, las noches frescas, y con esto los cambios de temperatura considerables. Sólo en las zonas altas del valle caen a veces heladas. Por las razones antes nombradas maduran aquí de la mejor forma uvas para vino tinto, conocidas por su necesidad de sol. En general, el valle representa veranos calurosos e inviernos suaves, libres de heladas en años normales, logrando que el Cabernet Sauvignon sea la cepa más sobresaliente, con intenso color, gran consistencia y cuerpo, además de delicados aromas y expresión frutal.

### **5. Valle de Cachapoal**

En el Valle de Rapel, ubicado a unos 100 kilómetros al sur de Santiago, se encuentran dos de las regiones vinícolas de Chile más prestigiosas y conocidas internacionalmente. Se trata del Valle Cachapoal, con su río del mismo nombre, al sur de Rancagua, así como del Valle Colchagua, el cual es irrigado por el río Tinguiririca. En cuanto al clima, la zona se

caracteriza por poseer el típico clima mediterráneo del valle central chileno: veranos calurosos e inviernos templados, además de grandes variaciones de temperatura entre el día y la noche., clima mediterráneo privilegiado. La existencia de marcados microclimas dependientes de la cercanía al mar o a las montañas, ofrecen variadas condiciones para el cultivo de diferentes cepas.

## **6. Valle Curicó**

Más en el sur que las otras regiones vinícolas conocidas, se extiende el Valle de Curicó, a unos 220 kilómetros de la capital Santiago. En esta zona el clima es mediterráneo moderado, con días calurosos en el verano y noches frías-húmedas. Los inviernos están bajo la influencia de la zona de alta presión del Pacífico, lo que se traduce en precipitaciones de aproximadamente 720 mm. anuales. Los suelos son planos, erosionados, ricos en minerales y con una buena permeabilidad. En las zonas más altas predominan la arena y las piedras. En esta zona se encuentra la superficie de cultivo de cepas de vino blanco más grande del país.

## **7. Valle Maule**

Se encuentra a unos 260 kilómetros de Santiago. La producción de vino en este frío valle fluvial, ubicado entre los Andes y la cordillera de la Costa. Las condiciones reinantes en el valle se caracterizan por un clima mediterráneo fresco, con inviernos lluviosos, y suelos ácidos y arcillosos, que, por un lado, reducen la productividad, pero por otro aumentan la calidad de las uvas. La cercanía a los ríos también influye en el vino, siendo más frutosos aquellos que nacen de cepas cultivadas en las cercanías de las aguas, que aquellos vinos de uvas provenientes de las laderas.

En el Valle del Claro las variaciones climáticas son amplias produciendo Cabernet Sauvignon y Merlot y, en una proporción menor, Sauvignon Blanc y Chardonnay. Destacables son el Merlot y Carmenère de Péncahue y el Cabernet Sauvignon de San Clemente, donde se producen muy buenos vinos de guarda. En el Valle de Loncomilla encontramos un clima mediterráneo. En los viñedos de la zona conviven dos realidades

opuestas: un sector constituido por variedades finas y otro, más antiguo y tradicional, por variedades comunes para consumo local.

### **8. Valle Bio-Bio**

La frontera más austral de las zonas vinícolas chilenas transcurre a lo largo del río Bío- Bío, a unos 500 kilómetros de Santiago. En este valle, se cultivan desde hace cientos de años las cepas rústicas de uva del país y moscatel para la producción de vinos de mesa. Por esto, la producción masiva de vinos simples representa la base de las actividades vitivinícolas a las orillas del Bío-Bío. Sin embargo, diferentes bodegas están trabajando en la producción de vinos de alta calidad. Respecto al clima, éste es frío y con mucho viento en las cercanías del Bío-Bío, incluso en verano; sus precipitaciones alcanzan los 1.100 mm anuales. Sus suelos son por naturaleza arenosos y pedregosos, y los depósitos orgánicos fluviales lo hacen fértil y productivo. Especialmente bajo estas condiciones crecen de buena forma las cepas nobles, ya que necesitan un período de maduración largo. El resultado son vinos naturales frescos y con acidez.

### **BIBLIOGRAFÍA**

<http://www.vinoschilenos.cl/valles.htm>

<http://www.winesofchile.org/wine-regions/>

## **ANEXO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS ACÉTICAS**

#### **1.1 Medio Glucosa GY (Glucosa Yeast Extracte)**

Glucosa 1 %.  
Extracto de levadura (Cultimed) 1%.  
Agua destilada hasta completar 1000 ml  
Autoclave 120°C, 15 min. Distribuirlo en tubos.

#### **1.2 Medio GYC (Glucose Yeast Extracte Carbonate)**

D-glucosa 5 %  
Extracto de la levadura (Cultimed) 1%  
CaCO<sub>3</sub> 0.5%  
Agar 2%  
Agua destilada hasta completar 1000 ml  
Autoclave 120°C, 15 min. Distribuirlo en placas de Petri (15-20 ml).

#### **1.3 Medio V 50**

Extracto de levadura (Cultimed) 0.4 %  
Glicerol 0.2 %  
K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0.05 %  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 %  
MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.02 %  
CaCl<sub>2</sub> 0.01 %  
Na acetato 0.1 %  
Etanol 6% (Se adiciona después de autoclavar el medio)  
El pH del medio líquido debe ser 4. Cuando se prepara el medio sólido, el pH debe ajustarse a 5.5- 6.0 y adicionar agar 1.5%  
Autoclave 120°C, 15 min., luego distribuirlo en tubos o placas

## 2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA

### Preparación de la muestra

Las bacterias se cultivan en medio líquido GY o V50 a 30°C, por 24-48 horas o se incuban en vino o vinagre durante 24 horas a 13°C.

### Tratamientos previos a la extracción de DNA

#### Lavado con PVP-EDTA al 2%

Se realizan dos lavados del precipitado con 500µl PVP-EDTA 2%

Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.

Eliminar el sobrenadante

Lavar el precipitado con 500µl agua Milli-Q.

#### Lavado con NaCl 1%

Lavar el precipitado con 1ml NaCl 1%

Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.

Eliminar sobrenadante

Lavar el precipitado con 500µl agua Milli-Q.

### **2.1. Método CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) (Ausubel *et al.*, 1992)**

1. Resuspender las células en 520µl de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM. Ajustar pH=8 con HCl)
2. Adicionar 30µl de SDS 20 % (20% dodecil sulfato de sodio), 3µl de Proteinasa K, homogenizar e incubar a 37°C durante 1 hora.
3. Adicionar 150µl 5M NaCl y 140 µl CTAB (5M NaCl; 10% CTAB) y homogenizar
4. Incubar 10 min. a 65° C y luego 5 min. en hielo
5. Adicionar 500µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
6. Centrifugar en frio a 10000 rpm por 10 min.
7. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml y adicionar 380µl de Isopropanol.
8. Centrifugar en frio a 10000 rpm por 10 min.
9. Eliminar el sobrenadante y adicionar 150µl de etanol al 70%
10. Centrifugar en frio a 10000 rpm por 10 min.

11. Eliminar el sobrenadante y secar el precipitado.
12. Resuspender el precipitado en 100µl de TE.

## **2.2. Power Soil DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Inc).**

1. Adicionar las células al tubo PowerBead y mezclar.
2. Adicionar 60µl de solución C1 y mezclar lentamente. Si la Solución C1 está precipitada, calentar a 60°C para su disolución.
4. Romper las células en el minibeatbitter. Para ello, poner los tubos a máxima velocidad 30 seg., seguido de una incubación en hielo de 30 seg. más, repetir 10 veces.
5. Centrifugar los tubos a 10000 x g por 30 seg. a temperatura ambiente, tener precaución de no exceder de 10000 x g, ya que los tubos se pueden romper.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.
7. Adicionar 250µl de Solución C2 y mezclar por 5 seg. Incubar a 4°C por 5 min.
8. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10000 x g.
9. Transferir 600µl de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.
10. Adicionar 200µl de solución C3 y mezclar lentamente. Incubar a 4°C por 5 min.
11. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10000 x g.
12. Transferir 750µl de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml.
13. Adicionar 1200µl de Solución C4 al sobrenadante y mezclar por 5 seg.
14. En el tubo con filtro, adicionar 675µl y centrifugar a 10000 x g por 1 min. a temperatura ambiente, eliminar el sobrenadante. Nota: Se requieren 3 operaciones para cada muestra.
15. Adicionar 500µl de solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg. a 10000 x g.
16. Descartar el líquido restante y centrifugar a temperatura ambiente por 1 min. a 10000 x g.
17. Retirar con cuidado el filtro del tubo y trasladarlo a un tubo limpio de 2 ml.
18. Adicionar 100µl de Solución C6 en el centro del filtro de membrana.



19. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg. a 10000 x g.
20. Descartar el filtro del tubo. El DNA se diluye en la solución C6. Se recomienda guardar el DNA a -20°C o -80°C.

### 2.3. Wizard Genomic DNA Purification (Promega)

1. Centrifugar 1 ml de cultivo “overnight” o 10 ml de vinagre o vino por 2 min. a 13000-16000 x g. Descartar sobrenadante.

Para las muestras de vinagre y vino, se realiza el protocolo completo para eliminar inhibidores (como si se tratase de bacterias Gram positivas). Mientras que con las muestras de medio de cultivo, la extracción comienza en el punto B.

#### *A. Bacterias Gram positivas*

1. Resuspender las células en 480µl de EDTA 50mM.
2. Adicionar 120µl de enzima lisozima (20 mg ml<sup>-1</sup>)
3. Incubar a 37°C por 1 hora
4. Centrifugar por 2 min. a 13000-16000 x g y eliminar el sobrenadante.
5. Seguir con lisis celular

#### *B. Bacterias Gram negativas*

##### *Lisis celular*

1. Adicionar 600µl de solución **Nuclei Lysis Solution** y mezclar suavemente.
2. Incubar por 5 min. a 80°C.
3. Adicionar 3µl de **RNAase Solution**. Mezclar e incubar a 37°C por 1 hora.

##### *Precipitación de proteínas*

4. Adicionar 200µl de **Protein precipitation solution** y mezclar.
5. Incubar en hielo por 5 min.
6. Centrifugar por 3 min. a 13000-16000 x g.

##### *Precipitación de DNA y Rehidratación*

7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml y adicionar 600µl de isopropanol y mezclar.
8. Centrifugar por 3 min. a 13000-16000 x g. y eliminar el sobrenadante.

9. Adicionar 600µl de etanol al 70% y mezclar.
10. Centrifugar por 3 min. a 13000-16000 x g. y eliminar el sobrenadante.
11. Secar el precipitado.
12. Rehidratar el precipitado (DNA) con 50µl de **Rehydration solution** por 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.

#### **2.4. Genomic DNA kit from NucleoSpin Food (Macherey-Nagel).**

1. Centrifugar 10 ml de muestra.
2. Transferir el pellet a un tubo limpio de 2 ml y adicionar 550µl Lysis Buffer CF (precalentado a 65°C). Mezclar suavemente (15 seg.), adicionar 10µl Proteinasa K y mezclar nuevamente (2-3 seg.).
3. Incubar a 65°C por 30 min., centrifugar la muestra por 10 min. (> 10000 x g).
4. Transferir el sobrenadante al tubo. Adicionar 1 volumen de Buffer C4 y 1 volumen de etanol.
5. Para cada preparación, en un tubo NucleoSpin® Food Column pipetear 750µl de la mezcla. Centrifugar por un minuto a 10000 x g. Descartar el líquido y repetir la operación 3 veces.
6. Primer lavado: Pipetear 400µl de Buffer CQW al tubo NucleoSpin® Food Column. Centrifugar por 1 min. a 11000 x g. Descartar el líquido sobrante.  
Segundo lavado: Pipetear 700µl de Buffer C5 al tubo NucleoSpin® Food Column. Centrifugar por 1 min. a 11000 x g. Descartar el líquido sobrante.  
Tercer lavado: Pipetear 200µl de Buffer C5 al tubo NucleoSpin® Food Column. Centrifugar por 2 min. a 11000 x g y eliminar completamente el Buffer C5.
7. Traspasar la columna NucleoSpin® Food Column a un nuevo tubo de 1.5 ml. Pipetear 100µl de Elution Buffer CE (precalentada a 70°C). Incubar por 5 min. a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 min. a 11000 x g y obtener el DNA.

### 3. TÉCNICAS MOLECULARES

#### 3.1. Análisis de los perfiles de restricción del amplificado del gen 16S del rRNA (RFLPs-PCR 16S r RNA; Ruiz *et al.*, 2000).

##### 3.1.1 Condiciones de la PCR

###### Preparación de la muestra:

1µl de cada uno de los partidores AcetiI y Aceti IV, (10 pm cada uno) (Ver tabla 1).

5µl de Tampón Taq 10x, sin Mg (Ecotaq).

3µl de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq).

4µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µl de cada uno (dilución 10 mM).

33µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q.

0,4µl Taq polimerasa (Ecotaq).

3µl de DNA extraído.

El programa utilizado para amplificar consiste en 35 ciclos de:

1 min. a 94°C (Desnaturalización)

45 seg. a 60°C (Hibridación)

2 min. a 72°C (Polimerización)

Al final 10 min. a 72°C para terminar de polimerizar.

##### 3.1.2. Gel para la visualización del amplificado

Preparar un gel al 1% (p/v) de agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim).

Añadir 1µl de Bromuro de etidio (Fluka Biochemika) por cada 25 mL de solución de TBE (Tris 89 mM; Ác. Bórico 89 mM; EDTA 2mM; pH=8), (concentración final: 0,4µg ml<sup>-1</sup>).

###### Preparación de la muestra:

5µl del DNA amplificado se le añade 1µl de azul de bromofenol (Glicerol 10ml; 0,2M Na<sub>2</sub> EDTA, pH: 8,3 10mL; Azul bromofenol 10mg; Xilene cyanol 10 mg). La visualización de la banda

del amplificado se realiza mediante un transiluminador de luz Ultravioleta y se compara con el marcador de 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL).

### **3.1.3. Digestión del amplificado**

#### Preparación de la muestra:

8µl del DNA amplificado

2µl del Tampón correspondiente según el enzima

1,5µl del enzima (Se utilizan 3 enzimas y sus tampones correspondientes (Boehringer Mannheim): *AluI*, *BccI* y *TaqI*).

8,5µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

Incubar según requerimiento de la enzima.

### **3.1.4. Gel de digestión del amplificado**

Preparar un gel al 3% (p/v) de agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim).

Añadir 1µl de Bromuro de etidio (Fluka Biochemika) por cada 25 ml de solución de TBE, (conc. final: 0,4µg ml<sup>-1</sup>).

#### Preparación de la muestra

A la muestra digerida se le añade 2µl de colorante azul de bromofenol (1:2 en H<sub>2</sub>O).

La visualización de los fragmentos de restricción se realiza mediante un transiluminador de luz Ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utiliza:

5µl del 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL).

## **3.2. Análisis de los perfiles de restricción del amplificado de los de espaciadores intergénicos (ITS) entre los genes 16S y 23S de rRNA (RFLPs-PCR ITS 16S-23S (Ruiz *et al.*, 2000)**

### **3.2.1. Condiciones de la PCR**

#### Preparación de la muestra:

0,3µl de cada uno de los partidores (ITS1 y ITS2, 10 pm cada uno) (Ver tabla 1).

3µl de Tampón Taq 10x, sin Mg (Ecotaq)

1,2µl de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq)  
1,2µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µl de cada uno (dilución 10 mM)  
22.7µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q  
0,3µl Taq polimerasa (Ecotaq)  
5µl de DNA extraído  
El programa utilizado para amplificar consiste en:  
Incubación 5 min. a 94°C  
35 ciclos de:  
30 seg. a 94° C (Denaturalización)  
30 seg. a 65°C (Hibridación)  
1 min. a 72° C (Polimerización)  
Al final 10 min. a 72°C para terminar de polimerizar.

### **3.2.2. Gel para la visualización del amplificado (Electroforesis en minigel de poliacrilamida al 8% y tinción con nitrato de Plata (1,5mm)).**

- Armar sets de cristales en los moldes
- Preparar el gel

#### Reactivos para un gel

<b>Agua destilada</b>	3,25 ml
<b>Acril-bis (15%-0,4%)</b>	6,6 ml
<b>TBE 5X</b>	2,5 ml
<b>APS (Persulfato de amonio) 25%</b>	6,5 ml
<b>Temed</b>	12,5µl

- Evitar la formación de burbujas al colocar el peine.

- Lavar los pocillos con agua destilada, colocar los geles en la cámara y llenar el depósito con TBE1x.
- Armar la cámara de electroforesis, asegurarse que no ocurra filtración del buffer interno.
- Realizar la electroforesis a 150 V. por 30 min.

### **Tinción con Nitrato de plata**

Fijar el gel con 50 ml Etanol-Ácido acético (1:1) y poner en el microondas a máxima potencia por 30 seg.

Sumergir el gel en 50 ml de AgNO<sub>3</sub> y poner en el microondas a máxima potencia por 20 seg.

Lavar suavemente 2 veces por 10 seg. con agua bidestilada.

Revelar con la siguiente mezcla: 0,5 ml formaldehído 37%, 20 ml NaOH 7,5% y 30 ml de agua bidestilada. Poner en el microondas a máxima potencia por 15seg.

Dejar sin fijar la tinción con 50 ml Etanol-Ácido acético (1:1), durante el tiempo necesario hasta visualizar las bandas.

Fotografiar.

### Preparación de la muestra

A 4µl del producto amplificado se le añade 2µl de colorante azul de bromofenol (1:2 en H<sub>2</sub>O). La visualización del fragmento amplificado se realiza mediante un transiluminador de luz blanca. Como marcador de peso molecular se utiliza: 5µl del 100 bp. DNA Ladder (Gibco BRL).

### **3.2.3. Digestión del amplificado**

#### Preparación de la muestra:

8µl del ADN amplificado

2µl de Tampón REact® 1 10X Invitrogen

1,5µl del enzima *A*luI

8,5µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

Incubar a 37°C por 3 horas.

### **3.2.4. Gel para la visualización de fragmentos de restricción (Electroforesis en minigel de poliacrilamida al 8% y tinción con nitrato de Plata (1,5mm)).**

El mismo procedimiento que en el apartado 3.2.2., sólo que la electroforesis se realizó a 150 V. durante 45 min.

## **3.3. AP-PCR (Análisis de los amplificados obtenidos con partidores arbitrarios)**

### **3.3.1. Condiciones de la PCR (Laohaprerththisan et al., 2003)**

#### Preparación de la muestra:

1µl del partidador P3 (2,5 pm/µl) (Ver tabla 1).

3µl de Tampón Taq 10x, sin Mg (Invitrogen)

1,2µl de Cloruro de Magnesio (2,0 mM, Invitrogen)

0,6µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µl de cada uno (concentración final 0,2mM de cada uno)

22,7µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

0,5µl Taq polimerasa (Concentracion final 0,08 pmoles/µl) (Invitrogen)

1µl de DNA extraído

El programa utilizado para amplificar consiste en:

Incubación 5 min. a 94°C

45 ciclos de:

1 min. a 95° C (Denaturalización)

1 min. a 36°C (Hibridación)

2 min. a 72°C (Polimerización)

### **3.3.2. Gel para la visualización del amplificado (Electroforesis en minigel de poliacrilamida al 8% y tinción con nitrato de Plata (1,5mm)).**

El mismo procedimiento que en el apartado 3.2.2., sólo que la electroforesis se realizó a 150 V. durante 50 min.

## **3.4. (GTG)<sub>5</sub>-PCR**

### **Condiciones de la PCR (De Vuyst *et al.*, 2007)**

#### Preparación de la muestra:

1µl de partidor (GTG)<sub>5</sub> (10 pm) (Ver tabla 1).

5µl de 5XGB (1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1M Tris-HCl; 1M MgCl<sub>2</sub>; 0.5M EDTA (pH 8.8); β-mercaptoetanol 14.4M)

0,4µl de BSA (100 mM, Ecotaq)

1,25µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µl de cada uno (dilución 10 mM)

13,45µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

0,4µl Taq polimerasa (Ecotaq)

1µl de DNA extraído

El programa utilizado para amplificar consiste en 30 ciclos de:

Incubacion 5 min. a 94°C

1 min. a 94°C (Desnaturalización)

1 min. a 40°C (Hibridación)

8 min. a 65°C (Polimerización)

Al final 16 min. a 65°C para terminar de polimerizar.

### **3.4.2. Gel para la visualización del amplificado**

Preparar un gel al 1.8% (p/v) de agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim). Las otras condiciones son iguales a las antes mencionadas (apartado 3.1.2.)



### 3.5. DGGE-PCR (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

#### 3.5.1. Condiciones de PCR (López *et al.*, 2003)

##### Preparación de la muestra

1µl de cada uno de los partidores (WBAC-1<sup>GC</sup> y WBAC-2, 10 pm cada uno) (Ver tabla 1)

5µl de Tampón Taq 10x, sin Mg (Ecotaq)

1,5µl de Cloruro de Magnesio (100 mM, Ecotaq)

0,4µl de dNTPs (Boehringer Mannheim) de una mezcla que contiene 1µl de cada uno (dilución 10 mM)

37,85µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

0,25µl Taq polimerasa (Ecotaq)

3µl de DNA extraído

El programa utilizado para amplificar consiste en 30 ciclos de:

1 min. a 95°C (Desnaturalización)

30 seg. a 67°C (Hibridación)

1 min. a 72°C (Polimerización)

Al final 5 min. a 72°C para terminar de polimerizar.

#### 3.5.2. Preparación del gel

1. Para realizar en forma adecuada los geles se tiene que preparar:

##### Solución de 100% (50 ml)

- 21 g. de Urea
- 20 ml de formamida
- 10 ml de bisacrilamida ;
- 1ml de TAE 50% (Tris base 242 g.; Ácido acético glacial 57,1 ml; 0,5M EDTA pH: 8 100 ml; agua destilada hasta completar 1 litro)
- Completar con agua destilada hasta los 50 ml.

##### Solución al 0% (50 ml)

- 10 ml 40% de bisacrilamida

- 1 ml TAE 50%;
- 39 ml de agua destilada

Se realiza el gel con estas dos soluciones con una bomba para que quede correcto el gradiente de concentraciones de las soluciones

2. Dejar el gel polimerizar durante unos 30-60 min. Quitar el peine del gel.
3. Situar el gel en el contenedor del baño TAE 1x calentado a 60°C. Correr el gel a 160V. por 4 horas.
4. Añadir el tampón de carga a las muestras (0,1 a 0,5 volúmenes de producto). Enjuagar las ranuras inmediatamente antes de cargar las muestras.

#### **Tinción del gel**

Teñir el gel durante 20-30 min. en 250 ml de TAE 1x, conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Si se observa un excesivo color de fondo puede introducirse un paso de desteñido de unos 15-20 min. en 250 ml de TAE 1x o agua. Examinar el gel bajo luz ultravioleta (254 nm.).

### **3.6. PCR en tiempo real (RT-PCR)**

#### **3.6.1. Cuantificación de bacterias acéticas totales (González *et al.*, 2006)-**

##### **Condiciones de la PCR**

##### Preparación de la muestra

- 12,5µl SybrGreen Master Mix
- 1,5µl QA1F (10µM) (Ver tabla 1)
- 1,5µl QA2R ((10µM) (Ver tabla 1)
- 4,5µl Agua Milli-Q
- 5µl DNA

El programa utilizado para amplificar consiste en:

- 2 min. a 50°C
- 10 seg. a 95°C

40 ciclos de:  
15 seg. a 95°C  
1 min. a 60°C

**3.6.2. Detección y cuantificación de diferentes especies de bacterias acéticas mediante la utilización de sondas TaqMan-MGB específicas de especie (Torija *et al.*, 2009).**

**Condiciones de la PCR**

Preparación de la muestra

12,5µl Master mix  
0,25µl PF (sol. Stock 10 µM) (Ver tabla 1)  
0,25µl PR (sol. Stock 10 µM) (Ver tabla 1)  
0,75µl sonda (sol Stock 10 µM) (Ver tabla 2)  
6,25µl Agua Milli-Q  
5µl DNA

El programa utilizado para amplificar consiste en:

10 seg. a 95°C  
40 ciclos de:  
15 seg. a 95°C  
1 min. a 62°C

**3.6.3. PCR específica previa a la PCR cuantitativa (Torija *et al.*, 2009).**

**Condiciones de la PCR**

Preparación de la muestra

5µl Tampón 10x sin Mg  
3µl Cloruro de Magnesio  
1µl dNTPs (10mM)  
1,5µl Primer-F (Partidor Forward es el mismo que en la TaqMan-MGB RT-PCR)

1,5µl Primer-R (Ver tabla 1)

0,4µl Taq polimerasa

32,6µl Agua milli-Q

5 µl DNA

El programa consiste en:

5 min a 94°C

15 ciclos de:

15 min. a 94°C

30 seg. a 62°C

Tabla 1. Partidores utilizados en cada técnica de identificación para bacterias acéticas.

Técnica	Partidores	Secuencias 5'-3'	Diseñados
PCR 16S rDNA	Aceti I	5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3'	Ruiz <i>et al.</i> , 2000
	Aceti IV	5'-GGAGGTGATCCAGCCGAGGT-3'	Ruiz <i>et al.</i> , 2000
PCR 16S-23S rDNA	ITS1	5'-ACCTGCGGCTGGATCACCTCC-3'	Ruiz <i>et al.</i> , 2000
	ITS2	5'-CCGAATGCCCTTATCGCGCTC-3'	Ruiz <i>et al.</i> , 2000
AP-PCR	P3	5'-GTAGACCCGT-3'	Laohaprertthisan <i>et al.</i> , 2003
PCR-DGGE	WBAC1 <sup>GC*</sup>	5'-GTCGTCAGCTCGTGTGAGAG-3'	López <i>et al.</i> , 2003
	WBAC2	5'-CCCGGGAACGTATTCACCGCG-3'	López <i>et al.</i> , 2003
PCR-(GTG) <sub>5</sub>	(GTG) <sub>5</sub>	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'	Vuyst <i>et al.</i> , 2006
RT-PCR	QA1F	5'-TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3'	González <i>et al.</i> , 2006
	QA2R	5'-TACACACGTGCTACAATGGCG-3'	González <i>et al.</i> , 2006
PF <i>Ga. europaeus</i>		5'-GGGTAAAGTCCCGCAACGA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PF <i>A. aceti</i>	5'-TGGAGCATGTGGTTAATTCTGA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PF <i>A. pasteurianus</i>		5'-TCAAGTCCTCATGGCCCTTATG-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PF <i>G. Oxydans</i>		5'-CCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGT-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PF <i>Ga. hansenii</i>		5'-GTCCACGTTGTAAACGATGTGT-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PR <i>Ga. europaeus</i>		5'-ACCTTCCTCCGGCTTGCA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PR <i>A. aceti</i>	5'-GCGGGAAATATCCATCTCTGAA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PR <i>A. pasteurianus</i>		5'-TCGAGTTGCAGAGTGCAATCC-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PR <i>G. oxydans</i>		5'-CCAGGGTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PR <i>Ga. hansenii</i>		5'-TGTGCTTATCGCGTAACTACGA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
PCR previa a RT-PCR	PR <i>A. pasteurianus</i>	5'-CCCATAGGAACCGGCAGTCT-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PR <i>A. aceti</i>	5'-GCCGATTGCTCAGCTCATG-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PR <i>G. oxydans</i>	5'-GTCATCCAACCTTCGTGGAGACA-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PR <i>Ga. hansenii</i>	5'-CCACGAGAAGACAGTTCCTTGCT-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009
	PR <i>Ga. europaeus</i>	5-CAGTCCAGTTACCCAGACCATCCTC-3'	Torija <i>et al.</i> , 2009

\*GC- secuencia (5'-GCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCCGCCCC-3').

Tabla 2. Sondas TaqMan-MGB descritas para bacterias acéticas.

<b>Técnica</b>	<b>Sondas TaqMan</b>	<b>Secuencias 5'-3'</b>	<b>Diseñados</b>
RT-PCR	<i>Gluconoacetobacter europaeus</i>	<b>VIC-TAGTTGCCATCACGTCTG-MGB</b>	Torija <i>et al.</i> , 2009
	<i>Gluconoacetobacter hansenii</i>	<b>VIC-TGGCCAAGCCATCCA-MGB</b>	Torija <i>et al.</i> , 2009
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<b>6FAM-TGGCTCGATACTGAC-MGB</b>	Torija <i>et al.</i> , 2009
	<i>Acetobacter aceti</i>	<b>VIC-CAGCCTCTCCATACAA-MGB</b>	Torija <i>et al.</i> , 2009
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<b>6FAM-TGGTGACACCATGCT- MGB</b>	Torija <i>et al.</i> , 2009

## BIBLIOGRAFÍA

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., 1992. In: Short protocols in molecular biology. Jonh Willey & Sons Inc (ed.), London.

De Vuyst, L., and Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 24, 120-127.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters* 254, 123-128.

Laohaprerthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C., and Nishibuchi, M., 2003. Prevalence and sero diversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiology and Infection* 130, 395-406.

López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Philster, T., Marshall, M., Vander-Gheynst, J., and Mills, D., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J.M., 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 rDNA and 16S-23SrDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1981-1987.

Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., and Mas, A., 2009. Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (submitted).



