



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL**

**Evaluación de diferentes técnicas
moleculares para la identificación de
Oenococcus oeni en mosto y vino**

Máster Universitario en Enología

Alumna:

Paula Piquer Fideli

Tutora:

Ana Jiménez Belenguer

Curso Académico: 2020-2021

Valencia, noviembre 2020

Evaluación de diferentes técnicas moleculares para la identificación de *Oenococcus oeni* en mosto y vino

Resumen

La comunidad de microorganismos utilizados en la elaboración de vino es muy diversa. Este trabajo se va a centrar en la especie *Oenococcus oeni*. *Oenococcus* es un género de bacterias Gram positivas, dentro del cual se encuentra la bacteria más conocida, *Oenococcus oeni* cuya misión es llevar a cabo la fermentación maloláctica que aporta una composición, color y unas características organolépticas que definen la calidad en muchos vinos, especialmente en los tintos.

El vino presenta una dinámica microbiana diversa que cambia desde el mosto hasta transcurrir la fermentación alcohólica y maloláctica. En los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares que permiten identificar los microorganismos en el vino para controlar el proceso de vinificación y así obtener el vino deseado. En este trabajo se van a evaluar las principales técnicas moleculares para la identificación de *Oenococcus oeni* y su identificación frente a las demás bacterias en el vino.

En este estudio se han descrito las principales técnicas moleculares divididas en dos apartados, el primero para la identificación de la bacteria *Oenococcus oeni* como especie y el segundo para la identificación de sus cepas. Cada apartado a su vez se ha dividido en tres secciones según se realizaba el análisis completo o parcial del genoma bacteriano. Para la identificación a nivel de especie se ha expuesto las técnicas de FISH, 16S-ARDRA, DGGE, PCR especie-específica y a nivel de cepa se ha puntualizado las técnicas de MLST, ITS-PCR, AFLP, RAPD y PCR en tiempo real.

Los estudios más recientes han demostrado que el PCR en tiempo real tiene muchas ventajas respecto a la PCR tradicional para la identificación a nivel de especie y cepa de la bacteria *Oenococcus oeni*.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, técnicas moleculares, FISH y qPCR.

Keywords: *Oenococcus oeni*, molecular techniques, FISH and qPCR.

Alumna: Paula Piquer Fideli

Tutora académica: Ana Jiménez Belenguer

Valencia, Octubre de 2020

Resum

La comunitat de microorganismes utilitzats en l'elaboració de vi és molt diversa. Aquest treball se centrarà en l'espècie *Oenococcus oeni*. *Oenococcus* és un gènere de bacteris Gram positives, dins del qual es troba el bacteri més conegut, *Oenococcus oeni* la missió del qual és dur a terme la fermentació malolàctica que aporta una composició, color i unes característiques organolèptiques que defineixen la qualitat en molts vins, especialment en els negres.

El vi presenta una dinàmica microbiana diversa que canvia des del most fins a transcórrer la fermentació alcohòlica i malolàctica. En els últims anys, s'han desenvolupat tècniques moleculars que permeten identificar els microorganismes en el vi per a controlar el procés de vinificació i així obtenir el vi desitjat. En aquest treball s'avaluaran les principals tècniques moleculars per a la identificació de *Oenococcus oeni* i la seua identificació enfront dels altres bacteris en el vi.

En aquest estudi s'han descrit les principals tècniques moleculars dividides en dos apartats, el primer per a la identificació del bacteri *Oenococcus oeni* com a espècie i el segon per a la identificació dels seus ceps. Cada apartat al seu torn s'ha dividit en tres seccions segons es realitzava l'anàlisi completa o parcial del genoma bacterià. Per a la identificació a nivell d'espècie s'ha exposat les tècniques de FISH, 16S-ARDRA, DGGE, PCR espècie-específica i a nivell de cep s'ha puntualitzat les tècniques de MLST, ITS-PCR, AFLP, RAPD i PCR en temps real.

Els estudis més recents han demostrat que el PCR en temps real té molts avantatges respecte a la PCR tradicional per a la identificació a nivell d'espècie i cep del bacteri *Oenococcus oeni*.

Paraules clau: *Oenococcus oeni*, tècniques moleculars, FISH y qPCR.

Abstract

The community of microorganisms used in winemaking is very diverse. This study is focussed on *Oenococcus oeni* species. *Oenococcus* is a genus of Gram positive bacteria, which is the best-known bacterium, *Oenococcus oeni* whose mission is to carry out malolactic fermentation that provides a composition, color and organoleptic characteristics that define the quality of many wines, especially red ones.

The wine presents a diverse microbial dynamics that change from the must to the alcoholic and malolactic fermentation. In recent years, molecular techniques have been developed that allow the identification and control of microorganisms in wine to control the winemaking process and thus obtain the desired wine. In this project the main molecular techniques for the identification of *Oenococcus oeni* and its identification against the other bacteria in wine will be evaluated.

In this study, the main molecular techniques are divided into two sections have been described, the first one for the identification of the bacterium *Oenococcus oeni* as a species and the second one for the identification of its strains. Each section has also been divided into three sections according to the complete or partial analysis of the bacterial genome. For the identification at species level, the techniques of FISH, 16S-ARDRA, DGGE, species-specific PCR have been exposed and at strain level the techniques of MLST, ITS-PCR, AFLP, RAPD and real-time PCR have been specified.

The most recent studies have shown that real-time PCR has many advantages over traditional PCR for the species and strain level identification of the *Oenococcus oeni* bacterium.

Keywords: *Oenococcus oeni*, molecular techniques, FISH y qPCR.

Agradecimientos

Agradezco todo el apoyo y el cariño recibido de mis padres, mi hermana, Mark y mi tutora, Ana.

ÍNDICE

1. Introducción general	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos generales	1
2. Review de investigación	2
2.1. Criterios de selección utilizados	2
2.2. Vinificación	2
3. Antecedentes bibliográficos	4
3.1. Fermentación maloláctica	5
3.2. <i>Oenococcus oeni</i>	9
3.2.1. Origen de <i>Oenococcus oeni</i>	9
3.2.2. Características de <i>Oenococcus oeni</i>	9
3.2.3. Genoma de <i>Oenococcus oeni</i>	11
3.3. Técnicas moleculares empleadas para la identificación de <i>Oenococcus oeni</i>	12
3.3.1. Identificación a nivel de especie	14
3.3.1.1. Análisis del genoma completo	14
3.3.1.2. Análisis de los operones ribosomales	14
o Identificación mediante 16S-ARDRA	15
o Identificación mediante DGGE	16
o Identificación mediante Hibridación	18
o Métodos usando ADN extraído de una cepa de cultivo	18
o Métodos aplicados para el estudio en colonias	18
3.3.1.3. Análisis de los fragmentos concretos del genoma	19
o Identificación mediante FISH	19
o Identificación mediante PCR especie-específica	20
3.3.2. Identificación a nivel de cepa	21
3.3.2.1. Análisis del genoma completo	21
o Identificación mediante RFLP-PFGE	21
o Identificación mediante AFLP	22
o Identificación mediante RAPD	23
o Identificación mediante Múltiplex RAPD-PCR	24
o Identificación mediante PCR- en tiempo real	25
3.3.2.2. Análisis de los operones ribosomales	26
o Identificación mediante ITS-PCR	26
o Identificación mediante Hibridación	28
o Identificación mediante Ribotipado	28
3.3.2.3. Análisis de los fragmentos concretos del genoma	29
o Identificación mediante MLST	29
5. Conclusiones	30
6. Referencias bibliográficas	31

1. INTRODUCCI3N GENERAL

1.1. JUSTIFICACI3N

El siguiente estudio bibliogr3fico tiene como objetivo evaluar las diferentes t3cnicas moleculares para la identificaci3n de *Oenococcus oeni*. La investigaci3n permitir3 aportar una s3ntesis de las t3cnicas empleadas para poder profundizar en el conocimiento cient3fico mediante la aportaci3n de diferentes investigaciones cient3ficas en el campo de la microbiolog3a enol3gica y m3s concretamente en la biolog3a molecular.

La evaluaci3n engloba la eficacia de las t3cnicas moleculares, el avance en el tiempo de estas t3cnicas para poder demostrar su efectividad. Para ello se propone un objetivo espec3fico: la identificaci3n de la bacteria *Oenococcus oeni* frente a las dem3s bacterias en el vino. Debido a la complejidad de estas t3cnicas moleculares, se han realizado varios estudios en los 3ltimos a3os, pero no he podido encontrar estudios espec3ficos de t3cnicas que engloben tanto entre especies como entre cepas.

Por ello que en el presente trabajo se van a resumir y evaluar las t3cnicas moleculares bacteriol3gicas m3s utilizadas y m3s innovadoras desarrolladas en los 3ltimos a3os. Realizando un listado de gran inter3s para los laboratorios enol3gicos y para el uso de los en3logos en las bodegas. Tamb3en se tendr3 en cuenta el factor econ3mico debido a la importancia que recae sobre las empresas.

1.2. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de este trabajo es describir y analizar las diferentes t3cnicas moleculares empleadas para la identificaci3n a nivel de especie y a nivel de cepa de *Oenococcus oeni*.

La identificaci3n de la bacteria *Oenococcus oeni* frente a las dem3s bacterias en el vino.

Nombrar las ventajas y desventajas de las t3cnicas moleculares seg3n las experiencias de los expertos.

Evaluar y comparar las t3cnicas moleculares mediante el resultado de los investigadores para determinar la t3cnica m3s efectiva, es decir, m3s r3pida, m3s simple y menos aparatosa.

2. REVIEW DE INVESTIGACIÓN

2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN UTILIZADOS

El procedimiento seguido para limitar la búsqueda ha sido buscar libros para la descripción de las partes teóricas, además de una búsqueda de numerosos artículos para la narración de los procesos experimentales utilizando las herramientas de Google Scholar, Scielo, Pubmed, Dialnet.

Una vez establecida una idea general del tema y la estructura del trabajo se procedió a escribir un índice y las ideas generales del trabajo. Esto se realizó siguiendo el procedimiento de recuperación de la información del primer paso mediante la combinación de palabras clave empleadas.

Tras aplicar las estrategias de búsqueda e información procedente de fuentes fiables se procedió a organizar el temario de manera que hubiese una introducción con una breve descripción de las bacterias a estudiar, sus características y su interés en el vino. Posteriormente una recopilación y descripción de las técnicas moleculares y finalmente una discusión y evaluación al final de cada técnica molecular.

Toda la información, los artículos, los libros, las fotografías y resultados de los artículos utilizados tienen una cita bibliográfica listada al final del trabajo en orden alfabético nombrado como referencias bibliográficas. Las referencias bibliográficas incluyen ideas e información de la información seleccionada. Se ha elegido el estilo APA que consiste en escribir entre paréntesis el apellido del autor junto a la fecha de publicación de este artículo o libro.

2.2. VINIFICACIÓN

La transformación del mosto al vino se produce mediante una combinación de procesos bioquímicos, biológicos y químicos llevados a cabo por diferentes microorganismos que pueden ser microorganismos autóctonos o microorganismos inoculados (que estarán añadidos a aquellos microorganismos que naturalmente ya están presentes) (Fleet *et al.*, 1984). Aunque unos estudios recientes llevado a cabo por Tantikachornkiat *et al.* (2020) y Qi *et al.* (2020) concluyeron que los vinos que no habían sido inoculados presentaban una mayor diversidad de bacterias y levaduras que aquellos vinos que habían sido inoculados (Tantikachornkiat *et al.*, 2020).

Puede producirse una o dos fermentaciones dependiendo del tipo de vino y el objetivo buscado. La fermentación maloláctica se produce en vinos tintos o blancos jóvenes cuando ha terminado o está a punto de terminar la fermentación alcohólica (Bravo, 1995; Delfini, 1983).

La primera fermentación es la fermentación alcohólica. Este proceso constituye un factor biológico de acción múltiple y secuenciada de especies. En el pasado, se realizaba la fermentación alcohólica espontánea protagonizada por levaduras *no Saccharomyces* durante las primeras fases de la fermentación alcohólica, mientras las

levaduras *Saccharomyces* dominaban las fases más tardías debido al alto contenido de etanol (Gutiérrez, 2018). Actualmente se realiza la inoculación de un cultivo iniciador puro de la cepa deseada para poder tener el control de la fermentación y evitar el crecimiento de cepas no deseadas (García, 2011).

La fermentación alcohólica es una reacción metabólica llevada a cabo normalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que degrada los azúcares presentes en el mosto en condiciones anaeróbicas y éstos son transformados en alcohol etílico y dióxido de carbono. Esta reacción se puede representar mediante la ecuación (Vázquez y Dacosta, 2007):



La segunda fermentación, también conocida como fermentación maloláctica se produce en la mayoría de vinos tintos y cada vez más en los vinos blancos. Es una biodesacidificación, esta fase es muy valorada ya que mejora notablemente la calidad del vino (Alexandre *et al.*, 2003; Kunkee, 1991).

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En 1866, Louis Pasteur fue el investigador francés que aisló las primeras bacterias. En 1913, Müller- Thurgau y Osterwalder explicaron la degradación bacteriana del ácido málico en ácido láctico mediante la fórmula conocida actualmente aunque concluyeron que la responsable era la bacteria *Bacterium gracile* (Ministerio, 2006). Vaughn (Vaughn y Techlistcheff, 1957) y Radler probaron en sus numerosos estudios que las bacterias lácticas presentes en el mosto de uva y en el vino pertenecían al género de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y, recientemente, *Oenococcus* (Dicks *et al.*, 1995).

En 1923, David Hendricks Bergey escribió un manual de bacteriología, el *Bergey's manual of determinative bacteriology* en el que describió todos los microorganismos que se conocían y hasta la fecha actual se sigue actualizando (Ricardo, 1999). Hasta ahora, las técnicas clásicas estaban basadas en el recuento de microorganismos (Cocolin *et al.*, 2010) y en el fenotipo que presentan las bacterias dando un resultado aproximado sobre el microorganismo estudiado (Jara, 2009).

La aparición de herramientas para la identificación correcta y precisa de microorganismos se produjo en 1978 por Hamilton Smith y Daniel Nathans desarrollando así técnicas basadas en el análisis de ADN. Estos investigadores descubrieron una enzima capaz de reconocer y cortar el ADN en secuencias específicas (Ricardo, 1999). Este descubrimiento junto al del descubrimiento del PCR en 1993 produjeron un gran cambio, el inicio de la genética molecular (Mesas y Alegre, 1999) (Ver tabla 1). Las primeras técnicas moleculares utilizadas fueron el análisis de proteínas totales (Dicks *et al.*, 1995), la hibridación ADN-ADN de ácidos nucleicos aplicadas sobre colonias (Lonvaud-Funel *et al.*, 1989) o sobre ADN purificado (Dicks *et al.*, 1990).

Posteriormente, se desarrollaron unas técnicas de hibridación fluorescente llamadas FISH (Blasco *et al.*, 2003). También se utilizaron técnicas combinadas con otras técnicas, en el caso del PCR se combinaba con la técnica de 16S-ARDRA y RFLP. Otros análisis se llevaron a cabo mediante los perfiles de restricción del ADN total con enzimas de corte frecuente (REA) (Prévost *et al.*, 1995) y de corte no frecuente (PFGE-RFLP) (Zapparoli *et al.*, 2000, Daniel *et al.*, 1993).

Recientemente, en octubre del 2020 se ha conseguido desarrollar un método, llamado la técnica CRISPR/Cas9, para editar el genoma bacteriano, es decir, producen cambios precisos en el ADN desde un par de bases a inserciones más grandes permitiendo la modificación del objeto eficiente en cultivos (Charpentier y DouADN, 2020).

Tabla 1. Investigadores de los Premios Nobel de Genética en el siglo XX hasta la actualidad (Ricardo, 1999; Karp, 2014).

Año	Investigador	Descubrimiento
1930	K. Landsteiner	Grupos sanguíneos
1933	TH Morgan	Cromosomas y herencia
1958	GW Beadle, J Lederberg	Recombinación genética bacteriana
1959	S Ochoa, A Kornberg	Síntesis ADN y ARN
1962	J Watson, F Crick	Modelo ADN
1965	Francois Jacob, Andre M. Lwoff, Jacques L. Monod	Operones bacterianos y ARN
1978	W Arber, D Nathans, HO Smith	Enzima de restricción
1980	Walter Gilbert	Tecnología de secuenciación de ADN
1993	K Mullis	PCR, amplificación génica
1997	SB Prusiner	Priones, proteínas, genes
2008	Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien	Descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP (utilizada como marcador en biología molecular).
2009	Thomas A. Steitz, Ada Yonath, Venkatraman Ramakrishnan	Estructura y función de ribosoma (ARNr)
2015	Tomas Lindahl, Paul L. Modrich, Aziz Sanchar	Reparación del ADN
2018	Frances Arnold	Evolución dirigida de enzimas (aplicado a la ingeniería)
2020	Emmanuelle Charpentier, Jennifer A. DouADN	Desarrollo de un método para editar el genoma.

3.1. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

La Fermentación Maloláctica, también llamada la fermentación secundaria, técnicamente no es una fermentación en sí sino una descarboxilación del ácido málico (dicarboxílico) a un ácido L-láctico (monocarboxílico) y producción de dióxido de carbono (en forma de burbujas) (Lonvaud-Funel, 1999). Necesitando como cofactores de la reacción NAD^+ y Mn^{2+} sin intermediarios libres (Naori *et al.*, 1990). Este proceso puede ocurrir espontáneamente mediante especies autóctonas o se puede inducir mediante *starters* de cultivos comerciales (Olguín, 2007) (figura 1).

La consecuencia de esta reacción es una desacidificación (Fernández, 2015), reduciendo la acidez total del vino en términos de 1- 3 g/L (en la cual la disminución del pH es proporcional a la concentración inicial de ácido málico) (Costantini *et al.*, 2009). Produciendo un gran número de compuestos finales metabólicos que producen cambios que afectan al pH, al color y que genera subproductos que afectan significativamente el perfil sensorial del vino (Suárez, 2015). Entre estos compuestos finales se puede destacar los compuestos carbonilos, los ésteres y los monoterpenos.

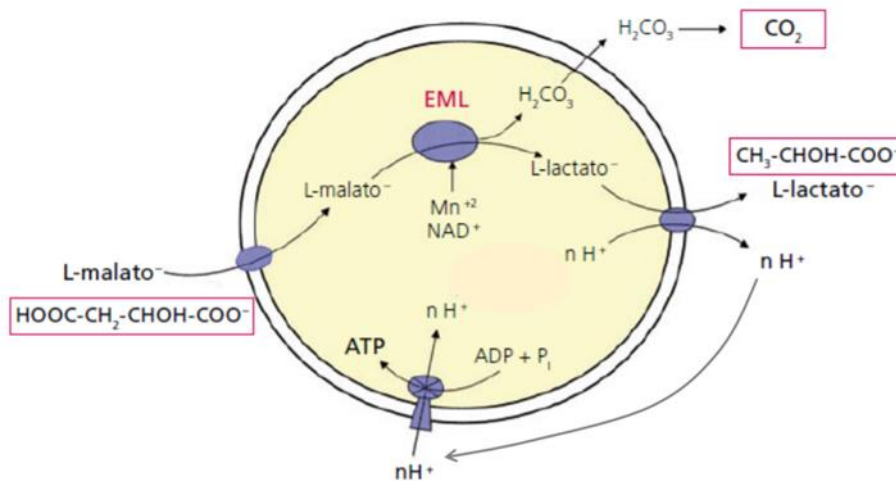


Figura 1: Fermentació malolàctica realitzada por *Oenococcus oeni* (Fuente: Bordons y Reguant, 2013).

Dentro de los compuestos carbonilos hay que destacar el diacetilo que es responsable del aroma a mantequilla o *Butterscotch* (Bartowsky, 2002). El diacetilo es un compuesto que se produce durante el metabolismo del ácido cítrico por las bacterias lácticas.

Los ésteres se producen por las levaduras tras la fermentación alcohólica, pero estos ésteres se modifican por la esterasa, una enzima presente en las bacterias lácticas (Matthews *et al.*, 2004). Las bacterias lácticas son responsables del aumento en la concentración de ésteres etílicos de ácidos grasos en vez de los ésteres de acetato (Cappello *et al.*, 2017; Lerm *et al.*, 2010). En un estudio se observó que el *Oenococcus oeni* cultivado en un medio etanólico producía niveles significativos de hexanoato de etilo y octanoato de etilo (ésteres etílicos de ácidos grasos) (Figura 2) (Costello *et al.*, 2013).

Los monoterpenos dependen de las variedades de uva que se han utilizado para la producción de ese vino, la mayoría de ellos presentes como compuestos volátiles libres. Aquellos compuestos que no son volátiles pueden desprenderse mediante la acción de glicosidasas. Un estudio realizado por Grimaldi *et al.* (2005b) demostró que la especie *Oenococcus oeni* había provocado algunas transformaciones mediante las glicosidasas. Otro estudio expuso que diferentes cultivos de *Oenococcus oeni* en la fase exponencial presentaban un nivel variable en la actividad de la β -glucosidase (Saguir *et al.*, 2009).

El resultado de la fermentación malolàctica es dar estabilidad debido a que el ácido málico hace inestables a los vinos, también le proporcionará un gusto que mejora el perfil sensorial del vino debido a que el ácido láctico es más suave y menos agresivo que el ácido málico. Además produce una pérdida de acidez que conlleva cambios importantes en las propiedades organolépticas como el color y el sabor (Mesas y

Alegre, 1999). Requerido en la mayoría de vinos tintos y también en algunos vinos blancos y espumosos.

Un aspecto importante a destacar en la fermentación maloláctica es la aparición o presencia de las aminas biógenas, las cuales se forman en los alimentos debido a la descarboxilación bacteriana de los aminoácidos, es decir, la aparición de aminas biógenas se debe a determinadas cepas que convierten los aminoácidos precursores en las aminas mediante vías metabólicas específicas (Arena and De Nadra 2001; Lonvaud-Funel 2001). La aparición de estas aminas es un indicador del deterioro de un vino. Se piensa que las cepas bacterianas del género *Pediococcus* y *Lactobacillus* pueden crear la aparición de aminas biógenas, (Mesas y Alegre, 1999) su presencia está relacionada con un pH alto en el vino (Marcobal *et al.*, 2004).

A pesar que multitud de bacterias son capaces de desarrollar la fermentación maloláctica, es *Oenococcus oeni* la bacteria más utilizada en la fermentación maloláctica debido a su gran tolerancia a las duras condiciones del vino, entre las que se destacan: su bajo pH y la alta concentración de etanol (Olguín, 2007). Es decir, la fermentación maloláctica es catalizada por las bacterias ácido lácticas, en la mayoría de casos y etapas de la fermentación es la especie *Oenococcus oeni* (Ancin-Azpilicueta *et al.*, 2008). Por ello estas bacterias son de gran importancia en el proceso de la vinificación y tienen gran interés científico y práctico.

Cabe destacar que de forma natural se encuentran diferentes cepas de *Oenococcus oeni*, las cuales por sí solas son capaces de llevar a cabo la FML, sin embargo para que los productores de vino puedan controlar la fermentación de forma adecuada, estos añaden directamente cepas de *Oenococcus oeni*.

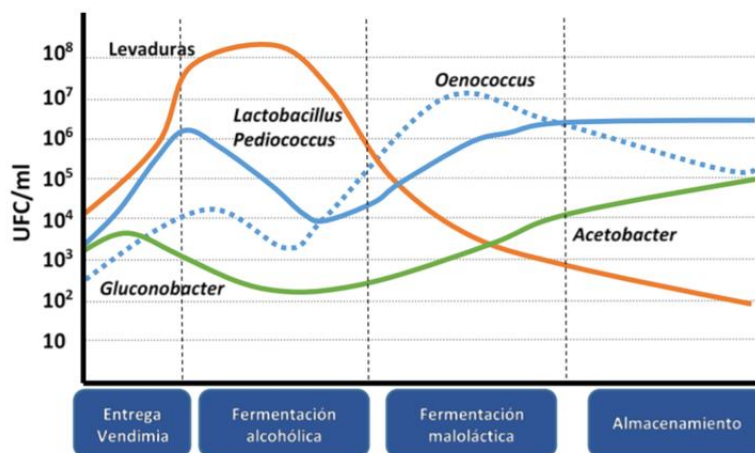
Actualmente las bacterias seleccionadas, *starters* o cultivos iniciadores, se inoculan en el mosto y poseen unas características deseadas para poder empezar y controlar con mayor precisión la población bacteriana. El objetivo es poder elegir la cepa con las características específicas deseadas para reacciones concretas y cuyos productos secundarios producidos por las bacterias sean los buscados, proporcionando una fermentación maloláctica con las características de los subproductos deseados (Mesas y Alegre, 1999). Generalmente se buscan cultivos iniciadores o *starters* con unas características concretas, entre ellas, que inicien su fase exponencial de crecimiento rápidamente para poder desarrollarse y crecer antes que la microbiota previamente existente. Deben tener *resistencia a factores adversos* como el etanol, un pH bajo y el sulfato. También, se busca un poder alto fermentativo y un carácter desacidificante. Además, del factor *killer* para poder imposibilitar el crecimiento de otras bacterias y así este *starter* tendría una población dominante desde el principio que permitiría realizar una vinificación controlada (Mesas y Alegre, 1999).

Realizar cultivos *starter* de *Oenococcus oeni* es necesario en la aplicación alimentaria por sus actividades metabólicas y por su estabilidad (Castello *et al.*, 2020). Aunque las bacterias pueden ser inhibidas por las condiciones duras que presenta el vino y por tanto hace que la fermentación maloláctica se retrase (Betteridge *et al.*, 2015).

La microbiota y su evolución en el vino

La microbiota y su evolución en el vino depende de muchos factores: de la localización geográfica, las condiciones climáticas, la edad de la viña, la variedad de la uva, el proceso de vinificación (Torija, 2002). Se produce una sucesión de poblaciones de microorganismos desde las uvas hasta el vino. La fermentación alcohólica se producía tradicionalmente de forma espontánea, donde las levaduras apiculadas tenían gran relevancia: *Kloeckera apiculata*, *Hanseniospora sp.*, *Rhodotorula sp.*, etc. por su bajo grado alcohólico, y habitualmente a mediados de la fermentación tendría un papel más destacado *Saccharomyces cerevisiae*. Pero actualmente, la mayoría de levaduras son seleccionadas y pertenecen al género *Saccharomyces* y habitualmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, estas levaduras estarían presentes desde el inicio de la fermentación alcohólica (Aleixandre y Álvarez, 2003).

Las levaduras inoculadas producen una disminución de la población bacteriana, pero facilitan el desarrollo de las bacterias. Tras la fermentación alcohólica, la población de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye aunque se mantiene presente hasta el vino final. Al principio de la fermentación maloláctica se observan bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, siendo *Lactobacillus* el género predominante y *Oenococcus* minoritario (López, 2004) (gráfica 1).



Gráfica 1. La ecología y su evolución de los microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas durante el proceso de vinificación y crianza. Representa la cantidad de células/ mL en cada fase de la producción del vino (Fuente: Lonvaud-Funel, 2006).

La tolerancia de *Oenococcus oeni* es tan alta que en vinos con un pH inferior a 3,5 solo y exclusivamente se podrán encontrar cepas de *Oenococcus oeni*, por otro lado, en vinos con un pH superior a 3,5 pueden contener diversas especies del género *Pediococcus*, además de cepas heterofermentativas pertenecientes al género *Lactobacillus* (Ministerio, 2006).

En un estudio realizado por Ruiz *et al.* (2010) se quería estudiar la población microbiana durante la fermentación maloláctica en varias bodegas. Realizaron un estudio y concluyeron que mientras *Oenococcus oeni*, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter siamensis*, y *Enterobacter sp.* estuvieron presentes en todas las bodegas,

Serratia sp. solo estuvo presente en unas pocas bodegas. Hay que destacar que *G. oxydans* y *Enterobacter sp.* estuvieron presentes en 57 y 59 muestras, de un total de 60 muestras, mientras que *O. oeni* estuvo ausente en 14 de 20 muestras tomadas al inicio de la FML (estado 0), apareciendo en todas las muestras tomadas en los progresivos estados. Se observó como las únicas especies que se mantuvieron hasta el final de la fermentación maloláctica (etapa 2) fueron: *O. oeni*, *G. oxydans*, y *Enterobacter sp* (Ruiz *et al.*, 2010).

3.2. OENOCOCCUS OENI

3.2.1. Origen de *Oenococcus oeni*

Es una bacteria Gram positiva perteneciente a las bacterias lácticas. Fue primero nombrada como *Leuconostoc oenos* por el científico Garvie en 1986 y en 1995 ya fue renombrada como *Oenococcus oeni* por Dicks (Dicks *et al.* 1995). Varios estudios filogenéticos concluyeron que el género *Leuconostoc* y *Oenococcus* tenían taxonomías muy distintas demostradas a través del 16S-ARNr y los análisis del 23S-ARNr, es decir, procedían de diferentes líneas evolutivas. Y fueron los resultados de las siguientes pruebas las que revelaron la taxonomía real; análisis de las secuencias de 23S-ARNr y 16S-ARNr (Martínez-Murcia *et al.*, 1993), hibridaciones de ADN-ADN (Dicks *et al.*, 1995; Garbie, 1981) y los perfiles de la solubilidad de las proteínas de la célula (Bergey, 2005; Dicks *et al.*, 1995).

3.2.2. Características de *Oenococcus oeni*

Oenococcus oeni es la bacteria más importante en vinificación debido a sus características, entre ellas, puede crecer en condiciones hostiles del vino durante la fermentación maloláctica.

Recientemente, se ha demostrado que se debe a la expresión del gen *hsp20* a través de un estudio realizado por Yiman *et al.* (2020). Se ha utilizado ese mismo gen en *E.coli* cuyos resultados han reflejado una mejora significativa a la resistencia de *E. coli* frente a las situaciones de estrés (Qi *et al.*, 2020). Los principales factores de estrés que hacen frente los microorganismos en el vino son los bajos pHs, el etanol, el SO₂ (Bech-Terkilsen *et al.* 2020) y disponibilidad de nutrientes (Castello *et al.*, 2020). Recientemente, en 2020 se ha descubierto que las cadenas medias de ácidos grasos también suponen un factor de estrés en el vino (Carreté *et al.* 2002). La mayoría de estudios se centran en solo un factor de estrés pero en el medio real, como en el vino, estas bacterias no solo se enfrentan a un solo factor, sino a varios factores o todos ellos combinados (Bech-Terkilsen *et al.* 2020).

Aún no se dispone de información sobre la mecánica de estabilización de la membrana como respuesta al estrés producido por SO₂ que ayudaría a comprender la variación en las diferentes cepas y mejorar los vinos inoculados (Bech-Terkilsen *et al.* 2020). Se ha intentado entender esta resistencia al estrés por el SO₂ utilizando las experiencias utilizadas en *E. coli* y *Salmonella sp* para aplicarlas al vino. Y hasta ahora

solo se ha podido informar sobre la mecánica de respuesta mediante el incremento de la síntesis de *Lo18* por Guzzo *et al.* (1997).

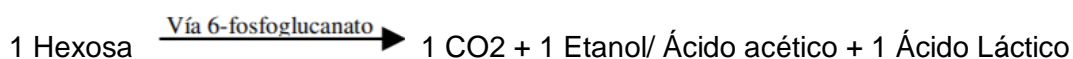
Otros estudios moleculares en la cepa de *Oenococcus oeni* SD-2a revelaron que el metabolismo central de carbohidratos, la producción de polisacáridos, el quórum de detección, la biosíntesis de la envoltura celular y las respuestas al estrés son los principales metabolismos implicados en la aclimatación al etanol en *Oenococcus oeni* liofilizado (Yang *et al.* 2020). La aclimatación al etanol mediante la modificación de la integridad celular y la producción de EPS mejoraron la supervivencia de las células liofilizadas. Adicionalmente, se reveló que el citrato es utilizado para el crecimiento de células liofilizadas de *Oenococcus oeni* (Yang *et al.* 2020).

Una gran explicación a la resistencia de los factores del estrés de *Oenococcus oeni* puede darse por poseer rutas de reparación del ADN. Esta hipótesis es debida al impacto significativo que tiene la acidez y el SO₂ en la integridad del ADN como se muestran en los estudios realizados por Bouix y Ghorbal (2015).

Aún no se sabe perfectamente qué genes están implicados en la resistencia a las condiciones de estrés. Entre los genes implicados en la resistencia al estrés (Mesa *et al.*, 2004) propuso que para la cepa *Oenococcus oeni* RS1 es la presencia del plásmido pRS1 implicado en la resistencia de condiciones de estrés, en este caso, el geraniol y los agentes antioxidantes SO₂. También, se ha observado que *Oenococcus oeni* produce gran cantidad de sHsp (small heat shock protein) *Lo18* en presencia de alcohol (Guzo, 2000; Guzo, 1993). Se ha demostrado que el gen *ctsR* tiene un rol importante en la respuesta al estrés en bacterias lácticas (Guzzo, 2011) y el gen *hsp18* frente a los factores etanol y pH en vinos y mostos que tenían más graduación alcohólica y menor pH.

Metabolismo de *Oenococcus oeni*

Su metabolismo es heterofermentativo, es decir, la bacteria consume las hexosas y las transforma en CO₂, etanol y/o ácido acético y ácido láctico (Pardo, 2003).



Las bacterias heterofermentativas oxidan una hexosa (glucosa) mediante la vía de las pentosas fosfato, produciendo una pentosa fosfato (xibulosa 5P). La pentosa fosfato (xibulosa 5P) se transforma en gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y acetil fosfato. Se crean dos rutas separadas: (1) El G3P se convierte en lactato produciendo ATP y (2) el acetil fosfato se reduce dando etanol sin producción de ATP. Durante este proceso, las bacterias heterofermentativas decarboxilan el 6-fosfogluconato para producir ribulosa 5 fosfato (ribulosa 5P) dando lugar a la formación de CO₂ (Llabaca, 2015).

En cuanto a sus condiciones de crecimiento, una bacteria mesófila cuya temperatura óptima es de 20 a 30°C. Es acidófila, es decir, puede crecer en pHs inferiores a 3,5. Además, tiene alta tolerancia al etanol y otros inhibidores naturales del vino y algunos caminos metabólicos (Mozzi *et al.*, 2015).

3.2.3. Genoma de *Oenococcus oeni*

En el 2005, se secuenció por primera vez el genoma de la cepa *Oenococcus oeni* PSU-1 (figura 2) revelando un genoma de 1 780 517 bp de tamaño (Mills *et al.* 2005). Actualmente, se han secuenciado más de 200 secuencias de otras cepas de *O. oeni*, como el genoma de la cepa de *Oenococcus oeni* OM27 que ha sido completado por Dongliang Yu *et al.* (2018) y depositado en DDBJ/ EMBL/GenBank bajo el número de identificación JNIS00000000. Recientes estudios en este tema han descubierto que las cepas de *O. oeni* pertenecen a dos grandes poblaciones (Bridier *et al.* 2010; Bihère *et al.* 2009) llamados A y B, y también se ha confirmado una población C por Lorentzen *et al.* (2019). Aquellas cepas pertenecientes al grupo A únicamente se han encontrado en el vino mientras que las cepas del grupo B, en el vino y en la sidra (Campbell-Sills *et al.* 2015). El grupo C se han encontrado en la sidra y descubrieron que estaban más relacionados con el grupo B (Campbell-Sills *et al.* 2015).

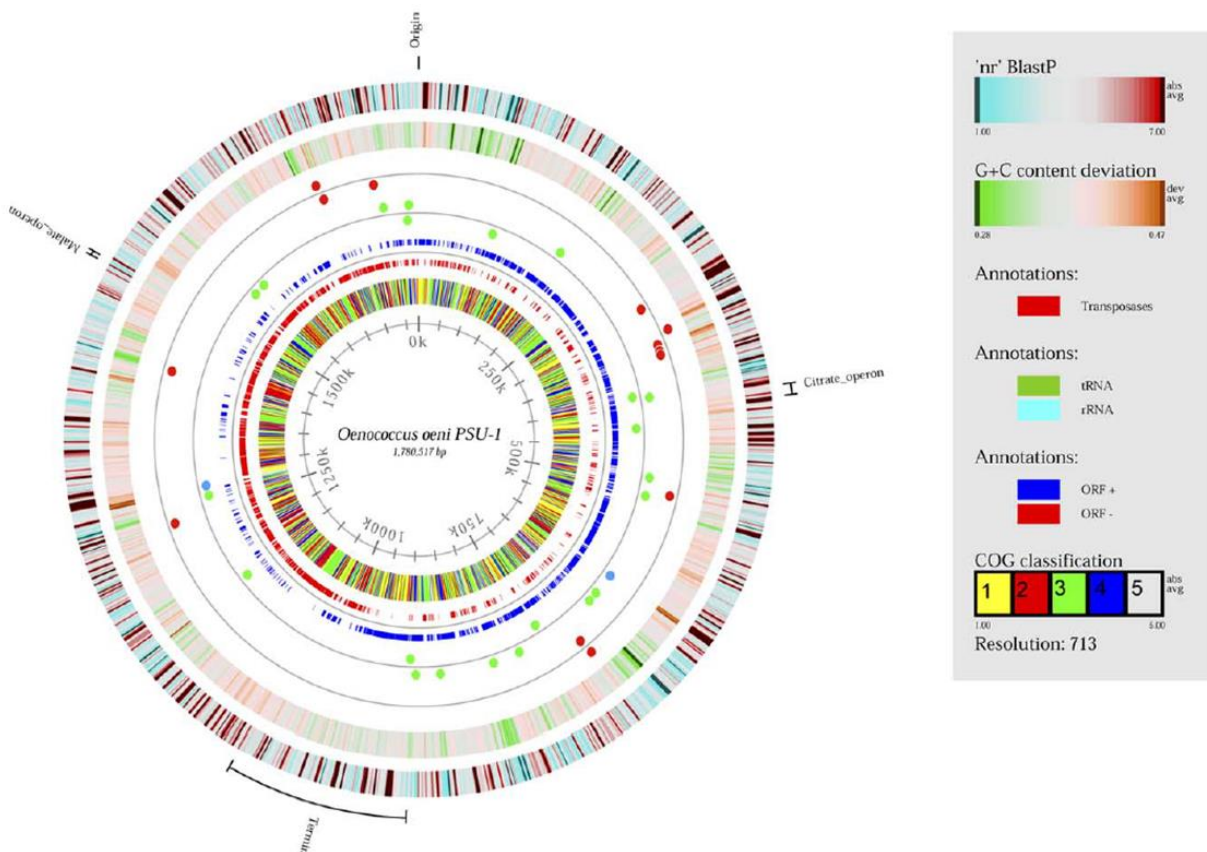


Figura 2. Representa el atlas genómico de *Oenococcus oeni* PSU- con un hipotético origen de replicación arriba. La predicción de los ORFs son: 1) Información del almacenaje y procesado, 2) Señalización y procesamiento celular, 3) metabolismo 4) caracterizado 5) ORFS con COGS sin caracterizar o sin COGS. (Fuente: Mills *et al.* 2005).

Oenococcus oeni tiene un genoma compacto formando alrededor de 1.8 Mb (Borneman *et al.*, 2012). Tiene tres genes situados en un clúster que son responsables

de la fermentación maloláctica: *mleA*, *mleP* y *mleR*. El gen *mleA* codifica para la enzima maloláctica; el gen *mleP* codifica para la permeasa de malato en el mismo operón y el gen *mleR* codifica para la proteína reguladora transcrita en la dirección contraria. La actividad máxima del gen *mleA* se observa a pH 5,0 y a 37°C y el etanol la inhibe de forma no competitiva.

Como se ha comentado anteriormente, el *Oenococcus oeni* produce diacetilos mediante el metabolismo del ácido cítrico. Unos estudios han mostrado la presencia de un grupo de genes *cit* que incluyen genes que codifican para la citrato liasa (*cit-DEF*), la citrato liasa ligasa (*citC*), oxaloacetato descarboxilasa (*mae*), y el transportador de citrato (*maeP* o *citP*) (Mills *et al.*, 2005). Se ha comprobado que el genoma también contiene genes implicados en la ruta de butanodiol (*ilvB*, *alsD*, *butA*).

3.3. TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *OENOCOCCUS OENI*

Conceptos clave

- Identificar: asignar a un microorganismo (cultivo puro) a una especie válida y bien caracterizada en base a las propiedades conocidas de ambos. Que sirve para determinar a qué especies pertenecen los microorganismos presentes en un determinado hábitat (ej: en el vino). Determinar qué especies son responsables de las fermentaciones o sus alteraciones. Conocer los microorganismos contaminantes.
- Tipificar: discriminar entre cepas muy relacionadas entre sí, debido a que pertenecen a la misma especie, pero no son clonales.
- Detectar: obtener evidencia de la presencia de un determinado microorganismo en una muestra sin necesidad de un cultivo o un aislamiento previo.

Las diferentes metodologías expuestas en este estudio se ordenaron en el siguiente orden: en primer lugar se expusieron las metodologías basadas en el análisis a nivel de especie, y en segundo lugar las metodologías basadas en el análisis a nivel de cepa. Se observan todas las técnicas organizadas según su umbral de identificación (tabla 2).

Tabla 2. Muestra las diferentes técnicas moleculares con sus rangos. FISH: Hibridación fluorescente *in situ*; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado; ITS-PCR: análisis del espaciador intergénico 16S-23S; RFLP: análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; RFLP-PFGE: análisis de fragmentos de restricción del ADN total cortado con enzima de baja frecuencia de corte; AFLP: Análisis de polimorfismos de fragmentos de digestión y posterior amplificación selectiva; RAPD: análisis de fragmentos de amplificación generados con cebadores que se unen aleatoriamente al ADN total; rep-PCR: análisis de fragmentos de amplificación de elementos repetitivos (Fuente: Savelkoul *et al.* 1999).

Familia	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciación de ADN				
Secuenciación de 16S-rADN				
FISH				
ARDRA				
Reasociación ADN-ADN				
ITS-PCR				
RFLP-PFGE				
AFLP				
RAPD-PCR				
rep-PCR				

Metodología de PCR

La metodología de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) consiste en amplificar las secuencias inespecíficas o específicas, mediante un termociclador. El proceso consiste en introducir en el termociclador, una muestra de ADN, posteriormente se añaden los elementos necesarios para poder obtener las copias/ amplificar la cadena de ADN introducida, los cuales serían:

- 1- ADN polimerasa: esta enzima es la encargada de replicar la cadena de ADN, para ello necesitará un sitio de la cadena al cual unirse llamado primer, y nucleótidos los cuales serán el material de construcción de la nueva cadena.
- 2- Cebadores o *primers*: estos se unirán a la cadena de ADN introducida permitiendo que se pueda unir la ADN polimerasa, permitiendo empezar la amplificación de la cadena de ADN.

- 3- Nucleótidos: también llamados dNTP, son las piezas fundamentales en las células eucariotas y se pueden distinguir cuatro tipos (adenina, guanina, citosina y tirosina), en cambio, al hablar de células procariotas, se intercambia la tirosina por uracilo. Los dNTPs son utilizados por la ADN polimerasa para construir la nueva cadena de ADN que se va a amplificar. Los dNTPs se unen entre sí formando una cadena nueva mediante la ayuda de una enzima llamada ligasa, la cual une a los dNTPs a través de un enlace fosfodiéster entre el fosfato 5' del donante y el hidroxilo 3' del aceptor de la cadena de ADN.

Una vez introducidos todos los ingredientes en el termociclador, se inicia la amplificación, la cual se puede dividir en tres ciclos o pasos:

- Ciclo 1: se eleva la temperatura a 95°C permitiendo que el ADN introducido se separe obteniendo 2 hebras de ADN separadas.
- Ciclo 2: se reduce la temperatura a 55-65°C, esto permite que los *primers* se unan a ambas y por consiguiente la ADN polimerasa también. La amplificación empieza cuando las condiciones de temperatura son óptimas.
- Ciclo 3: se aumenta la temperatura a 72°C, la cual es la temperatura óptima para la ADN polimerasa, la cual empieza la amplificación, copiando la cadena de ADN, tras terminar este ciclo se repite todo otra vez duplicando una única muestra multitud de veces.

Cabe destacar que el vino y el mosto contienen sustancias inhibitorias de la PCR, es por ello que las muestras a analizar mediante PCR deben ser debidamente preparadas y purificadas (Ibeas *et al.*, 1996).

3.3.1. Identificación a nivel de especie

3.3.1.1. Análisis del genoma completo

Son métodos que permiten la hibridación con ADN cromosómico total marcado o la secuenciación del genoma completo.

3.3.1.2. Análisis de los operones ribosomales

Estos análisis se basan en utilizar parte del genoma bacteriano para identificar a la especie. Las más utilizadas son las que utilizan el operón ribosomal exactamente la molécula 16S (gen 16S). El gen 16S es importante porque es una molécula universal, es decir, está presente en todas las bacterias además de ser fácil de identificar debido a que hay gran cantidad de secuencias accesibles al público y permiten las comparaciones entre todas las especies de bacterias, una base de datos mencionada en este trabajo es GenBank. Además, la molécula 16S presenta zonas conservadas a lo largo de la evolución de las mismas especies y zonas variables entre diferentes especies. Por tanto, permite una identificación a nivel filogenético (Karp, 2014). Los últimos estudios han revelado que el operón ribosomal está compuesto principalmente

por genes housekeeping que son los encargados de los polimorfismos del ribotipado (Bouchet *et al.*, 2008).

El procedimiento a seguir es amplificar el gen 16S-ARNr con *primers* comunes a todas las bacterias. Posteriormente, se debe purificar la banda amplificada y se realiza la secuenciación por electroforesis capilar. Finalmente se comparan las secuencias de la especie estudiada con las del banco de especies. La similaridad entre ambos tiene que ser igual o superior al 97% para que se asigne una especie.

Identificación mediante 16S-ARDRA

El método de *Amplified rDNA Restriction Analysis* (ARDRA) nombrado como el análisis de restricción de la 16S-ADNr amplificado (PCR-ARDRA) o análisis de restricción del ADN ribosómico 16S amplificado (16S-ARDRA) descrito por Vaneechoutte *et al.* (1992) se ha utilizado para la diferenciación de *Oenococcus oeni*, a nivel de especie, de otras bacterias lácticas en el vino (Blasco, 2009; Sato *et al.*, 2000). Las bacterias poseen tres tipos de ARNr, la fracción 23S, 16S y 5S. Actualmente se utiliza con mayor frecuencia la 16S debido a su alta disponibilidad de secuencias de la fracción 16S del ARNr en las bases de datos mundiales que facilita la identificación (OIV, 2012).

El procedimiento a seguir empieza por la amplificación y posterior digestión de partes del operón ribosomal, es decir, se produce la amplificación del gen 16S-ARNr utilizando *primers* o iniciadores comunes a todas las bacterias. Posteriormente, se realiza una digestión con enzimas de restricción cuyas dianas son conservadoras a nivel de especies. Por lo tanto, se formarán fragmentos de diferentes tamaños que al separarlos mediante electroforesis en el gel de agarosa convencional mostrarán un patrón de bandas. Se compara el patrón de bandas obtenido con el patrón de bandas de las especies de referencias para obtener la identificación de la especie (Blasco, 2009).

Un estudio realizado por (Rodas *et al.*, 2003) consistía en evaluar la técnica de 16S-ARDRA para una rápida identificación de bacterias lácticas de 376 muestras aisladas del mosto y del vino. Una vez la muestra ya estaba amplificada se realizó un análisis de restricción del gen de 16S-ARNr utilizando las enzimas de restricción Bfal, Msel and Alul de forma secuencial, esta restricción se realizó para la fácil identificación de las bacterias lácticas.

Este estudio es bastante preciso debido a que se identificaron 32 de las 36 especies de bacterias lácticas de referencia, las cuales pertenecían a cinco géneros distintos, entre ellos el género *Oenococcus* (Rodas *et al.*, 2003). También es un método rápido comparado con los métodos de RFLP-PFGE, RAPDs y ribotipado, y en algunos casos el método de 16S-ARDRA requiere una base datos extendida para compararla con los perfiles complejos.

Identificación mediante DGGE

La técnica de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE y TGGE), también llamada electroforesis en gel con gradiente desnaturante, ha sido diseñada para la separación secuencial específica de los fragmentos amplificados mediante PCR. Esta técnica permite la separación de los amplicones de las cadenas de polimerasa del mismo tamaño pero con diferentes secuencias. Los amplicones en los geles migran y se van desnaturando y finalmente se detienen cuando los fragmentos del ADN han sido desnaturados por completo (Pozo *et al.*, 2009).

La técnica de PCR-DGGE se realiza tras la extracción del ADN de la muestra, es decir, es la amplificación de las regiones hipervariables de los genes que codifican para el 16S ARN ribosomal o otros genes como el gen *rpoB*, es decir, un gen que codifica la subunidad de la polimerasa de ARN. Los resultados por la amplificación de ADN darán secuencias de nucleótidos con el mismo tamaño pero con diferentes secuencias. Si este ADN proviene de diferentes especies, se separarán mediante la electroforesis en el gel de poliacrilamida que contendrá urea y formamida (ambos crean un gradiente de componentes desnaturantes). Los fragmentos de ADN de la doble hélice migran a través del gel hasta que se desnaturan por las condiciones químicas y se detienen.

Hay un “GC clamp,” es decir, un primer de PCR con una pinza G + C de unos 50 pb cuya función es evitar que la doble hélice de ADN se disocie por completo. La posición en el gel donde el fragmento de doble hélice de ADN se ha desnaturado y se ha convertido en una única hélice de ADN depende de la secuencia de nucleótidos que presente y el contenido en porcentaje de G + C. Los fragmentos de ADN de las diferentes especies se detienen en diferentes posiciones del gel debido a que las diferentes secuencias de nucleótidos tienen diferentes dominios de derretimiento. Esto es debido a que las concentraciones de un agente desnaturante separan la doble hélice de ADN en diferentes dominios internos entonces cuando el dominio con la menor temperatura de unión llega a la concentración del agente desnaturante en el gel, ese ADN se disocia parcialmente produciendo moléculas con menor velocidad (Fischer y Lerman, 1983).

Los resultados de la amplificación del ADN de todas las especies de bacteria en la muestra se verán separados mediante la distancia de migración en el gel. La identificación final de las especies de bacteria que se han separado se obtendrán de dos maneras, o identificando mediante la distancia de migración respecto al ADN de la especie de referencia o mediante la purificación y secuenciación de cada banda y posteriormente comparándola con los datos encontrados en el Gen Bank (Gen Bank, www.ncbi.nlm.nih.gov/gov/blast/) (OIV, 2012).

En el estudio realizado en una bodega en Castilla-La Mancha (Ruiz *et al.*, 2010) se estudió la comunidad bacteriana en dos añadas presente durante la fermentación maloláctica en el vino tempranillo dividiéndose el estudio en estado 0 (final de la fermentación alcohólica e inicio de la fermentación maloláctica), estado 1 (fermentación maloláctica) y estado 2 (final de la fermentación maloláctica). Se realizó

el estudio con la técnica PCR- DGGE y posteriormente la identificación final de las especies de bacteria se realizó purificando y secuenciando cada banda y comparándola con los datos del Gen Bank.

Al secuenciar estas muestras se observó que correspondían a las porciones de genes de la 16S-ARNr y posteriormente se compararon con los datos en Gen Bank. Los resultados revelaron que la mayoría de ellos tenían $\geq 97\%$ de similitud a los genes de la 16S-ARNr por lo que se llevó a cabo la identificación de las especies encontradas que eran comunes en los vinos: *Oenococcus oeni* y *Gluconobacter oxydans*.

Algunos autores han utilizado este método de PCR-DGGE para estudiar la estructura y la evolución de las comunidades microbianas en diferentes ambientes (Liu *et al.* 2010; Liu *et al.* 2009; Lubbs *et al.* 2009; Petersson *et al.* 2009; Puglisi *et al.* 2009; Ponnusamy *et al.* 2008) incluyendo las fermentaciones de alimentos (Giannino *et al.* 2009; Endo y Okada 2005; Meroth *et al.* 2003). Todos estos autores se pusieron de acuerdo en este método comentando que fue efectivo para el estudio de las comunidades de microorganismos.

Otro estudio llevado a cabo por Spano *et al.*, (2007) que estuvo basado en la técnica de PCR-DGGE utilizando el gen *rpoB* como marcador molecular, comenta la reproducibilidad de esta metodología y ha demostrado que es muy útil para poder controlar la población microbiana durante la fermentación del vino (Pozo *et al.*, 2009).

Se realizó otro estudio sobre las poblaciones de bacterias en la fermentación maloláctica espontánea en el vino de tempranillo en 2010. Según lo publicado por Andorrà *et al.* (2008), la técnica de DGGE resultó un método muy viable para detectar la diversidad de especies dentro de una población bacteriana mixta, aunque la presencia predominante de una población disminuye las probabilidades de detectar otras especies presentes en menor cantidad (Ruiz *et al.*, 2010).

Esta técnica permite la identificación de las bacterias lácticas en el vino a nivel de especies en una población microbiana mixta (OIV, 2012). Es una técnica aplicada para evaluar la diversidad microbiana en determinados ambientes (Ercolini, 2004; Cocolin *et al.*, 2000). También se ha utilizado para poder examinar la pureza de las cepas bacterianas de esta manera permite un seguimiento de las muestras de bacterias y así poder estudiar las dinámicas poblacionales según los cambios ambientales (Reguant y Bordons, 2003). Recientemente, la técnica de DGGE se ha utilizado para el estudio de la microbiología del vino y algunos autores han conseguido realizar un perfil de las especies del vino (Spano *et al.*, 2007; Renouf *et al.*, 2006, 2007, Bae *et al.*, 2006). Al principio López *et al.* (2003) utilizó las regiones 16S-ADN ribosomal como objeto del ADN, pero recientemente se ha utilizado el gen *rpoB* housekeeping como objeto del ADN y este cambio ha permitido una diferenciación a nivel de especie directa (Renouf *et al.* 2007, Spano *et al.* 2007; Renouf *et al.* 2006; Rantsiou *et al.* 2004).

La técnica de DGGE es una técnica analítica molecular de cultivo muy útil en el mosto y en el vino para conocer las poblaciones microbianas mayoritarias dentro de una población microbiana. Es una técnica que permite identificar perfiles bacterianos basándose en su composición de nucleótidos G+C.

La gran desventaja a destacar es la posible co-migración de bandas de distintas especies a la misma posición del gel, por lo que algunas bandas no pueden identificarse (Alonso, 2013; Pozo *et al.*, 2009). La presencia de bajas concentraciones de los microorganismos hace que éstos no sean detectados dentro de las poblaciones microbianas en el vino (Ruiz *et al.*, 2010). Además, esta técnica necesita un equipo sofisticado (Spano *et al.*, 2007). Generalmente, esta técnica no es capaz de distinguir especies muy cercanas filogenéticamente aunque en el caso de *Oenococcus oeni* no sucede así, y pueden diferenciarse de una manera fácil (Pozo *et al.*, 2009).

Identificación mediante Hibridación

La técnica de hibridación o también llamada “Spot” (dot-blot) es una técnica basada en sondas de ADN específicas para la especie o a una región del genoma bacteriano.

Se basa en la hibridación de ADN-ADN en las que los ácidos nucleicos complementarios pueden hibridar con el ADN dependiendo de las condiciones del medio (temperatura y condiciones del medio). Primero, se desnaturaliza la única hebra de ADN, nombrándose como *objeto* al ADN extraído de la bacteria para ser identificado. En el caso que el *objeto* y la *sonda* (una hebra de ADN) tengan secuencias idénticas o suficientemente parecidas, ambas se re-asocian en condiciones de hibridación.

La sonda es la clave para determinar el nivel taxonómico y según la sonda elegida puede dar información de una parte del genoma o del genoma entero. En la mayoría de los casos se utilizan sondas de 16S-ADNr para la identificación de especies. Aunque, a veces pueden producirse *hibridaciones cruzadas* y se deben encontrar otros genes o regiones específicas. Dependiendo de las aplicaciones existen dos metodologías distintas:

- **Métodos usando ADN extraído de una cepa de cultivo para ser identificada.**

El objeto ADN es extraído de un cultivo y se fija en una membrana. La sonda de ADN toma contacto con la membrana bajo las condiciones de hibridación (temperatura correcta). Tras la hibridación se lavan los restos y la membrana se trata con híbridos reveladores.

- **Métodos aplicados para el estudio en colonias.**

La membrana se extiende encima de la superficie del agar con las colonias. Se retira la membrana y en esa membrana se habrán transferido las colonias que han permanecido por simple contacto. Se produce la lisis celular para que la sonda se ponga en contacto con el ADN de las colonias. Tras la hibridación, se obtiene una imagen que revela las colonias que son de la misma especie que las de la sonda.

Identificadas a nivel de especies en bacterias lácticas en el vino o identificadas mediante una función especial, como una actividad enzimática (OIV, 2012).

3.3.1.3. Análisis de los fragmentos concretos del genoma

Identificación mediante FISH

Otra técnica utilizada para la identificación de *Oenococcus oeni* (Ferrer, 2013; Blasco *et al.*, 2003) fue *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) descubierta por Pinkel y Gray (1984) también conocida como técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia. Es decir, es una técnica en la cual se elige una sonda de ADN que hibrida con un gen o una región del genoma que se busca y por tanto se marcan con un fluorocromo (Olguín *et al.*, 2006) (figura 3).

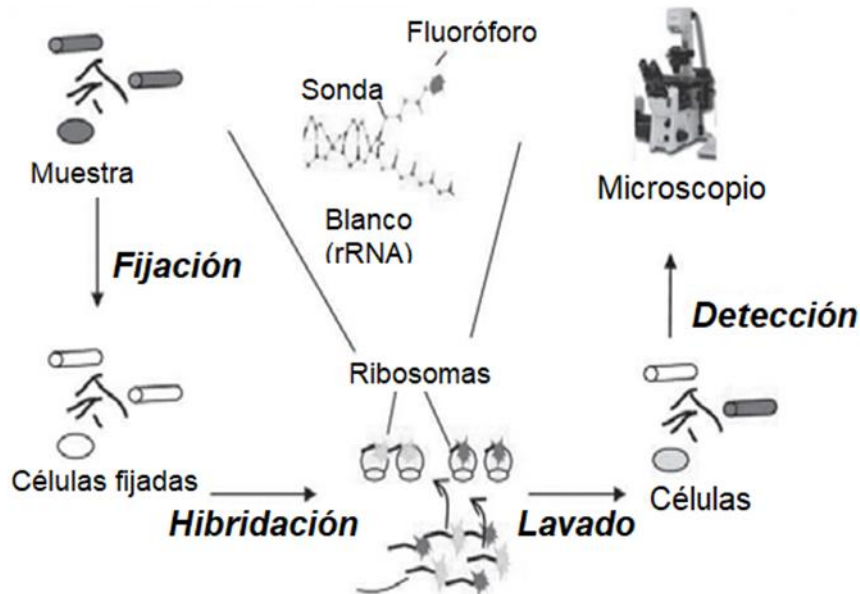


Figura 3. Diagrama de flujo de un típico procedimiento de FISH. (Fuente: Rodríguez, 2011)

Es una técnica basada en marcar con fluorescencia unas sondas especie- específicas. En la que el ARN ribosomal es el objeto de estas sondas. La primera etapa consiste en alcanzar el ADN dentro las células bacterianas para que la sonda encuentre la secuencia complementaria en el 16S-ARN del ribosoma. En este paso el fluorocromo se unirá a las células que se ajusten con la sonda. La observación del resultado se realizará mediante el microscopio epifluorescente (OIV, 2012).

En un estudio realizado por (Hirschhäuser *et al.*, 2005) se secuenció la región del espaciador transcrito interno 23S-5S (ITS-2) y el 5S-ADNr de cinco cepas diferentes de *Oenococcus oeni* y tres bacterias lácticas relacionadas filogenéticamente, tras analizar las cadenas descubrieron que habían diferencias muy grandes entre las cadenas de las cepas y las de bacterias lácticas. Es por ello que decidieron diseñar tres oligonucleótidos específicos marcados con fluorescencia para realizar la técnica de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Éstos tendrían una secuencia complementaria a la región 5S-ADNr, posteriormente se utilizaron en una mezcla los tres oligonucleótidos con fluorescencia junto con las cepas de *Oenococcus oeni* y las bacterias lácticas mencionadas anteriormente. Tras realizar la técnica *FISH*, se observó que la hibridación se produce correctamente y las cadenas de la región 5S-

ADNr de las cepas de *Oenococcus oeni* emitían fluorescencia la cual fue fácilmente detectada, permitiendo la rápida identificación de las mismas.

Este método se utiliza para la detección, cuantificación e identificación de varios tipos de microorganismos en la misma muestra si se utilizan sondas de diferentes colores para identificarlas. También se identifican cepas específicas (OIV, 2012). Esta técnica se ha utilizado para el seguimiento de la población bacteriana durante la vinificación y guarda de vinos (Olguín *et al.* 2006).

Según el artículo publicado por Blasco *et al.*, (2003) los resultados obtenidos mediante la técnica de FISH fueron muy rápidos, debido a que no es necesario el cultivo de las muestras, y se produjo la identificación microbiana en unas pocas horas (4- 16 horas). Como inconveniente, la observación bajo el microscopio es limitada debido a su baja sensibilidad. La principal desventaja es que solo se detectarán las especies que tengan una sonda diseñada para ellas (Blasco, 2009).

Como conclusión, la identificación de *Oenococcus oeni* mediante FISH y PCR con *primers* específicos para una región es una técnica muy efectiva y muy rápida (Pozo *et al.*, 2009) para realizar el control de calidad en un cultivo *starter* en el vino y en mezclas complejas (mosto) (Hirschhäuser *et al.*, 2005). Utilizando sondas específicas de especie en la técnica de hibridación *in situ* de FISH permite identificar diferentes microorganismos con diferentes filogenias. Sin embargo, el contenido reducido del ARNr de un microorganismo puede enmascarse con la fluorescencia de fondo en la muestra y por tanto no ser detectado (Rodríguez, 2011). Además, solo detecta las especies las cuales se ha diseñado una sonda para ellas (Olguín *et al.*, 2006).

Identificación mediante PCR especie-específica

La técnica de PCR especie-específica consiste en diseñar dos *primers* que codifican para una región de 1025 pares de bases de un gen perteneciente a *Oenococcus oeni* que codifica para la enzima maloláctica, posteriormente se realiza una PCR anidada. El factor más importante de esta técnica es su especificidad debido a que los resultados de la PCR sólo son positivos en *Oenococcus oeni* cuando el ADN aportado (como referencia) pertenecen al ADN purificado de *Oenococcus oeni* (Zapparoli *et al.*, 1998).

Esta técnica se utiliza para la identificación de las especies de bacterias lácticas encontradas en el mosto o en el vino (OIV, 2012). Este método es uno de los más rápidos, pudiendo realizarse en tan solo ocho horas (Zapparoli *et al.*, 1998). A pesar de la rapidez de esta técnica, la principal desventaja es el tiempo empleado en la preparación y purificación de las muestras de ADN.

PCR anidada

La metodología de la PCR anidada (o *Nested PCR*) es una variante de la PCR convencional. Consta de dos reacciones de PCR para la amplificación con distintos pares de *primers* en cada fase. En la primera PCR se utilizan unos *primers* externos para la amplificación de una secuencia más extensa, que contiene un segmento diana

(el segmento objeto). Y posteriormente, se utiliza la amplificación obtenida para realizar una segunda PCR en la cual se utilizan dos *primers* internos para la amplificación de una región específica.

Como ventajas habría que destacar que tiene una alta sensibilidad y especificidad. La especificidad es mayor debido a amplificación de un amplicón (es un conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una PCR) previo, los *primers* sólo hibridan dentro de la molécula y el resultado se expresa en una banda. Por lo que es un método útil para identificar una especie de una bacteria. Como desventaja, no se puede cuantificar la muestra (González *et al.*, 2013).

3.3.2. Identificación a nivel de cepa

3.3.2.1. Análisis del genoma completo

Identificación mediante RFLP-PFGE

La técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism - Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (RFLP-PFGE), también llamado polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción analizado por electroforesis en campo pulsante descubierto por Jeffreys (1984). Es una técnica muy utilizada para la investigación de bacterias en la microbiología de los alimentos (Vernile *et al.*, 2009).

Esta técnica utiliza enzimas de restricción que digieren el ADN microbiano, por lo que el genoma se fragmenta en cortes irregulares (Pozo *et al.*, 2009). Las bacterias procedentes de los cultivos se recogen mediante centrifugación y se trasladan a unos bloques de agarosa. Para asegurarse que el corte del ADN bacteriano se realiza únicamente por la enzima y no por cortes mecánicos, la lisis de las células bacterianas y la restricción genómica DBA se produce en los bloques de agarosa (Pardo *et al.*, 1998). Los bloques de gel se cargan dentro del gel de agarosa y los fragmentos son separados por electroforesis PFGE. Es decir, a través del campo eléctrico de pulso se consigue separar los fragmentos grandes generados por los cortes irregulares de las enzimas (OIV, 2012).

Se ha demostrado que los enzimas de restricción utilizados para informar sobre el polimorfismo entre las cepas de *Oenococcus oeni* son las endonucleasas Apa I. (Zapparoli *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 1998) Y se ha demostrado que los enzimas Sfi I, Not I y Sma I son efectivas para diferenciar a nivel de especie las bacterias del vino del género *Lactobacillus* (Rodas *et al.*, 2005).

La Identificación mediante RFLP-PFGE, es la técnica más fiable para la discriminación de *Oenococcus oeni* y para la identificación de especies de bacterias lácticas en el vino. (OIV, 2012). Es una técnica muy utilizada para el estudio de la población bacteriana en las fermentaciones malolácticas inoculadas debido a que distingue las cepas de *Oenococcus oeni* nativas de las inoculadas (Hernández *et al.*, 2007; Pozo-Bayón *et al.*, 2005; Gindreau *et al.*, 1997) es decir, evalúa la supervivencia del cultivo iniciador y el establecimiento después de la inoculación para la FM (OIV, 2012). Esta

técnica es menos utilizada para el control de la pureza de los cultivos durante la producción de los iniciadores de la fermentación, una ventaja añadida es que es reproducible y si se sospecha que las enzimas de restricción no han actuado correctamente se puede usar una segunda enzima para subsanar los posibles errores producidos.

Según algunos investigadores, el método de PFGE es muy utilizado (Zapparoli *et al.* 2000; Tenreiro *et al.* 1994; Daniel *et al.* 1993; Kelly *et al.* 1993) además de ser una técnica de alta reproducibilidad que da información sobre los perfiles buscados. Es una técnica fácil de analizar aunque es muy laboriosa (Ferrer, 2003).

La técnica de PFGE es muy útil para establecer diferentes poblaciones (Vigentini *et al.*, 2009) y diferenciar a nivel de cepa *Oenococcus oeni* en el vino (Hernández *et al.* 2007; Gindreau *et al.*, 1997;), también para distinguir las cepas salvajes presentes en bodega de las cepas inoculadas de *Oenococcus oeni* (Hernández *et al.* 2007; Gindreau *et al.*, 1997) aunque no es muy recomendable para las bodegas por la alta inversión económica (Pozo *et al.*, 2009). La técnica de PFGE es ligeramente más discriminante que MLST (González, 2013).

La principal desventaja se debe a que es una técnica bastante laboriosa y de larga duración debido a la necesidad del cultivo preliminar antes de la restricción. Además, requiere un equipo especializado y económicamente elevado (Pozo *et al.*, 2009).

Identificación mediante AFLP

La técnica *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) o también llamada polimorfismos de fragmentos de amplificación desarrollada por Vos *et al.* (1995). Está basada en la detección de polimorfismos de fragmentos generados por la digestión del ADN total y posterior amplificación mediante la PCR con *primers* específicos y selectiva de algunos de estos fragmentos de digestión (Bertani *et al.*, 2019).

En primer lugar, se necesita poca cantidad de muestra de ADN. La muestra de ADN es digerida por dos enzimas de restricción: una con una variación de frecuencia de corte media (como EcoR I) y una segunda de corte muy frecuente (como Mse I o Taq I). Los adaptadores de los oligonucleótidos están diseñados para que no se restauren después de la ligadura en la zona de restricción inicial permitiendo una restricción y una ligadura simultáneas. Posteriormente se somete a una PCR con *primers* específicos para el adaptador para que se dirijan al fragmento de restricción cromosómica desconocido. Se realiza una electroforesis que revela de 40 a 200 bandas. Los resultados obtenidos son polimórficos debido a las mutaciones de las zonas de restricción, a las mutaciones en las secuencias al lado de las zonas de restricción y a las complementarias a las extensiones selectivas de *primers*, y a las inserciones o deleciones en los fragmentos amplificados.

Como principal ventaja, muestra una buena reproducibilidad, es decir, se producen los mismos resultados en diferentes laboratorios (Savelkoul *et al.*, 1999), al ser una técnica que no depende de la hibridación, la digestión parcial o de un determinado patrón hace que la reproducibilidad sea muy efectiva. Siendo eficiente para las

identificaciones a nivel de especies y nivel de cepas. También, es una técnica productiva, capaz de generar muchos marcadores moleculares en una reacción. Además, de un alto poder discriminatorio, no requiere información previa sobre las secuencias de ADN de las muestras (Savelkoul *et al.*, 1999). Aunque tiene un alto precio (Bertoni *et al.*, 1999; Savelkoul *et al.*, 1999) y no sería interesante para una bodega.

Bertani *et al.* (2019) han conseguido realizar un protocolo de AFLP más corto, más eficiente y más económico (Kunene *et al.*, 2000). También, es necesaria poca cantidad de muestra (Savelkoul *et al.*, 1999) analiza todo el genoma bacteriano y es fácil de realizar. La detección de fragmentos muy pequeños depende de la sensibilidad del PCR utilizado y la cantidad de ADN utilizado. Otra gran desventaja, es la sensibilidad a la calidad del ADN de la muestra (Bertani *et al.*, 2019).

Identificación mediante RAPD

El método de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) también nombrado como fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar. Consiste en un método en el que se usa un único *primer* de secuencia corta y aleatoria de unos 10 nucleótidos de manera que será frecuente encontrar varias secuencias al azar con las que hibride el *primer* con el genoma microbiano. Posteriormente mediante una PCR se podrá amplificar estos fragmentos específicos. Al ser una técnica basada en la PCR se debe controlar algunos factores como la baja temperatura, ciclos de amplificación, TaqADN polimerasa empleada y la integridad de la cadena molde de ADN.

El polimorfismo se observa como presencia o ausencia que se marca mediante un marcador dominante. La ausencia de banda viene de un microorganismo homocigoto para la mutación que causa la pérdida de unión del *primer*. Mientras que la aparición de bandas viene de un microorganismo heterocigoto u homocigoto dominante para el alelo al que se une el *primer*.

Este método es muy utilizado por su simplicidad, debido a que se pueden obtener resultados tras una PCR seguida de una electroforesis. Otra ventaja de esta metodología es que no se requiere mucha información previa de la secuencia, se necesita poca cantidad de ADN, la muestra de ADN no hace falta que sea muy pura, no se necesita mucha capacitación técnica y es económico. Además, identifica a nivel de cepa debido a que se obtienen amplificaciones de diferentes tamaños según el tipo de cepa.

Como desventajas hay que destacar la necesidad de alelos dominantes, también al estar basados en un PCR de *primer* de una secuencia muy corta, se tiene que utilizar ciclos de hibridación del *primer* con temperaturas bajas, y eso produce una falta de reproducibilidad, si no se realizan en condiciones óptimas. Es decir, la reacción es muy sensible a las condiciones de amplificación, y es necesaria una concentración suficiente del ADN, la cual influye en la reproducibilidad del método.

Una vez se obtienen los resultados de la electroforesis, se han de interpretar, tomando como referencia la banda *patrón*, y gracias a él podemos saber la longitud de las otras bandas. Cuando hay presencia de una banda en el gel se transformará en un 1 en la matriz de datos. Y cuando hay ausencia de banda en el gel se convertirá en un 0 en la matriz de datos. Posteriormente, esta matriz de datos se transformará en una matriz de distancias en los que se utilizan diferentes coeficientes de similitud. Los coeficientes de similitud se basan en la similitud de los patrones de mayor coincidencia de banda y mayor coincidencia de ausencias de banda junto con un menor número de discrepancias entre las bandas.

A la hora de interpretar los resultados, si en el gel observamos dos bandas en la misma posición, significa que estas bandas tienen la misma longitud, sin embargo, podrían tener distinta secuencia, esto es debido a que podrían ser ampliaciones de distintas partes del genoma. Por otro lado, si obtenemos una coincidencia de ausencias de banda, esto podría estar causado por diferentes tipos de mutaciones y se podría confundir con un parecido genético, o con una mutación.

Esta metodología se utiliza para la identificación de bacterias lácticas en el vino a nivel de cepas y para poder controlar la población bacteriana durante la fermentación maloláctica. La efectividad del método depende de la secuencia de los *primers*. La gran desventaja es la poca reproducibilidad de los resultados (OIV, 2012).

Algunos autores han demostrado la alta eficacia en la identificación a nivel de cepa de la técnica de RAPD (Vigentini *et al.*, 2009; Zavaleta *et al.*, 1997) comparándola con otras técnicas como la técnica PFGE (Reguant y Bordons, 2003). La técnica de RAPD-PCR es un método muy preciso (Vigentini *et al.*, 2009; Zapparoli *et al.*, 2000); para el seguimiento de las cepas iniciadoras de la fermentación maloláctica y *Oenococcus oeni* en las bodegas (Reguant y Bordons, 2003). A pesar de no ser sensible ni a la cantidad ni a la calidad de muestra (Reguant y Bordons, 2003). Esta técnica es muy sensible a las condiciones de amplificación necesitando que sean constantes en el tiempo, por ejemplo, temperaturas bajas (Chen, 2019).

Identificación mediante Múltiplex RAPD

Cómo hemos mencionado antes, en la metodología de RAPD-PCR, se utiliza un único *primer*, mientras que en la metodología de múltiplex RAPD-PCR, se utilizaron dos o más *primers* al mismo tiempo en la PCR, uno de ellos está formado por 10 bases de oligonucleótidos al azar y el otro primer es específico para el gen maloláctico que está compuesto por 23 bases. Es una técnica utilizada para diferenciar entre cepas de *Oenococcus oeni* (Reguant *et al.*, 2003). Consta de una técnica que se ha utilizado con otras bacterias y ha dado buenos resultados (Holt y Cote, 1998; Neilan, 1995).

Un estudio que se llevó a cabo en la bodega *Mas dels Frares* (Facultad de Enología, en la universidad de Rovira y Virgili) utilizaron el método de Multiplex PCR-RAPD para tipificar cepas de *Oenococcus oeni*. Las cepas utilizadas se obtuvieron en su mayoría de tres añadas pertenecientes a los años 1997, 1998 y 1999. En primer lugar, se realizó el aislamiento de las bacterias de los vinos e identificaron la especie. Mediante la técnica de PCR específica descrita por Zapparoli *et al.* (1998) se identificaron 1000

aislados de los cuales 800 pertenecían a la especie *Oenococcus oeni*. En la PCR se observó una banda en la especie *Oenococcus oeni* correspondiente a un fragmento de bases del gen del enzima maloláctico de esta especie. Para tipificar las cepas de *Oenococcus oeni* se realizó el Multiplex PCR-RAPD. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando los *primers* Coc y On2. Tras finalizar el ensayo de los 800 aislados de *Oenococcus oeni*, de los cuales se observaron 31 cepas diferentes de *Oenococcus oeni* (Reguant *et al.*, 2003). Además, se descubrió como al finalizar las fermentaciones malolácticas destacaban una o dos cepas siendo una de ellas la dominante y la responsable de la mayoría de fermentaciones malolácticas.

Se trata de un método muy eficiente y rápido, el ensayo se realiza en seis horas y es muy sensible permitiendo distinguir cepas diferentes pero muy similares. Además, este método ha permitido una buena reproducibilidad aplicada para la identificación de poblaciones de *Oenococcus oeni* en los resultados tras tres añadas en la misma bodega (Reguant y Bordons, 2003).

Identificación mediante PCR a tiempo real

La PCR *a tiempo real* o PCR *cuantitativa* (qPCR) desarrollado por Mullis (1993). Es una variante de la PCR que usa unos *primers* marcados para la detección y cuantificación de la fluorescencia de los productos de la PCR que se han emitido por la amplificación. La fluorescencia se mide durante la amplificación según la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo (Pinzani *et al.* 2004).

Se expuso un método para la rápida detección de *Oenococcus oeni*, para ello desarrollaron unos *primers* específicos y una sonda fluorogénica dirigida al gen que codifica la enzima de la FML, estos fueron utilizados en una PCR en tiempo real con el fin de poder cuantificar el ADN, tanto de los cultivos de bacterias puros (preparados en placas de agar), cómo en muestras de vino (Pinzani *et al.* 2004).

El resultado final fue muy positivo ya que se confirmó que el método era específico para *Oenococcus oeni* (respecto a 6 especies distintas de bacterias lácticas), pudiendo identificarlo en 6 horas, además de permitir que varias muestras se procesasen simultáneamente. Otra ventaja muy importante fue que no era necesario tener cultivos vivos en medios de agar. La obtención de muestras puras suele ser un proceso lento de hasta varias semanas, debido al lento crecimiento de las bacterias. La qPCR permitió ahorrar aún más tiempo y se ha convertido en una de las técnicas más rápidas que hay en la actualidad (Pinzani *et al.*, 2003).

Otro factor a tener en cuenta es que esta técnica es muy sensible detectando células de *Oenococcus oeni* en un rango óptimo desde 2×10^3 hasta 1×10^9 células por mL^{-1} , siendo el límite de detección fue de 15 células mL^{-1} demostrando una alta sensibilidad (Pinzani *et al.* 2004).

Se ha utilizado para la identificación y cuantificación *Oenococcus oeni* en el vino (Neeley *et al.*, 2005). Esta técnica también permite la cuantificación de microorganismos perjudiciales para el vino en la vinificación y tras el embotellado (Martorell *et al.*, 2005; Phister *et al.*, 2003). Siendo la PCR a tiempo real muy eficaz

para la detección de bacterias productoras de aminas biogénicas y para la evaluación del riesgo de la producción de estas sustancias por poblaciones bacterianas (Pozo *et al.*, 2009). Una de las desventajas más importantes es elevado precio y la necesidad de tener personal altamente cualificado para llevarlo a cabo.

La gran ventaja de la PCR a tiempo real es que ofrece la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de una secuencia de ADN de interés. Es decir, la rapidez en producir los resultados para poder estimar la población de una muestra, controlar el crecimiento bacteriano durante la fermentación y así poder realizar las acciones correspondientes para corregir los problemas en el momento (Pinzani *et al.*, 2004). Los procesos de amplificación y detección se producen en el mismo vial que permanece cerrado por lo que reduce el riesgo de contaminación (Schaad y Frederick, 2002; Heid *et al.* 1996). Por contra, esta técnica no diferencia entre las células viables y las no viables debido a que detecta el ADN y por tanto el ADN sigue presente tras la muerte de la célula (Pinzani *et al.* 2004).

3.3.2.2. Análisis de los operones ribosomales

Identificación mediante ITS

La técnica de *Internal Transcribed Spacer* (ITS) basado en el análisis del espaciador intergénico 16S-23S. Es decir, las bacterias poseen fragmentos de ARNr localizados dentro de un operón, las fracciones pueden ser 23S, 16S y 5S, y se separan entre sí por las ITS que son las secuencias intergénicas (OIV, 2012).

Se pueden realizar mediante la elección de dos secuencias distintas: 1) la secuencia de nucleótidos de *rpoB* que codifica una subunidad de la ARN-polimerasa, solo hay una copia en el gen en las bacterias. 2) La secuencia de nucleótidos de ITS situada entre los genes del 16S y 23S del ARNr se puede usar para la identificación pero esta secuencia que está menos conservada. Se requiere la extracción del ADN del cultivo puro que se utiliza como molde para la PCR. Para la PCR se utilizan *primers* de las zonas conservadas universales de ambas partes del ITS, dentro de los genes que codifican el 16S-ARNr y 23S-ARNr. Posteriormente, se realiza una electroforesis, los resultados amplificados se purifican y se realiza la secuenciación. Los resultados obtenidos de los genes que codifican para el 16S-ARNr o *rpo B* y se comparan con genes disponibles en los bancos de datos (OIV, 2012; Sato *et al.*, 2001).

Los ITS al estar situados en el operón bacteriano, y al existir varias copias del operón dentro de la mayoría de bacterias, provocan que puedan cambiar la longitud y la secuencia de los distintos fragmentos intergénicos (Navarro *et al.*, 1992).

Esta técnica permite la identificación a nivel de especie, de cepa, incluso la clasificación filogenética por la gran variabilidad que tienen estas regiones (ITS) utilizando una base de datos con todos los genes bacterianos.

Identificación mediante Hibridación

Métodos de Ribotipado para *Oenococcus oeni*.

La metodología de ribotipado está basada en la identificación y clasificación taxonómica de las especies de bacterias basada en la secuencia genética del 16S ARNr debido a que hay una conservación intraespecífica de esta secuencia (Fox *et al.*, 1980).

El ribotipado convencional (figura 4) está basado en la separación del ADN genómico mediante enzimas de restricción, posteriormente una electroforesis, un Southern blot y una hibridación de fragmentos de ADN transferidos con una sonda de operón ribosomal radiomarcada. Se visualizan los resultados en forma de bandas que contienen una porción del operón ribosomal mediante autorradiografía. La cantidad de fragmentos que se producen mediante ribotipado indican la multiplicidad de operones de ARNr presentes en una especie bacteriana (Bouchet *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Zavaleta *et al.*, (1997) que consistió en la identificación mediante el método 23S-ADNr-RFLP de 70 cepas de *Oenococcus oeni*; 37 cepas se obtuvieron de las colecciones de cultivo y 33 cepas se obtuvieron del aislamiento del vino de España, Perú y Chile, el análisis de ribotipado se llevó a cabo mediante las enzimas EcoR1 o HindIII y tras obtener los resultados de la electroforesis se observaron tres bandas.

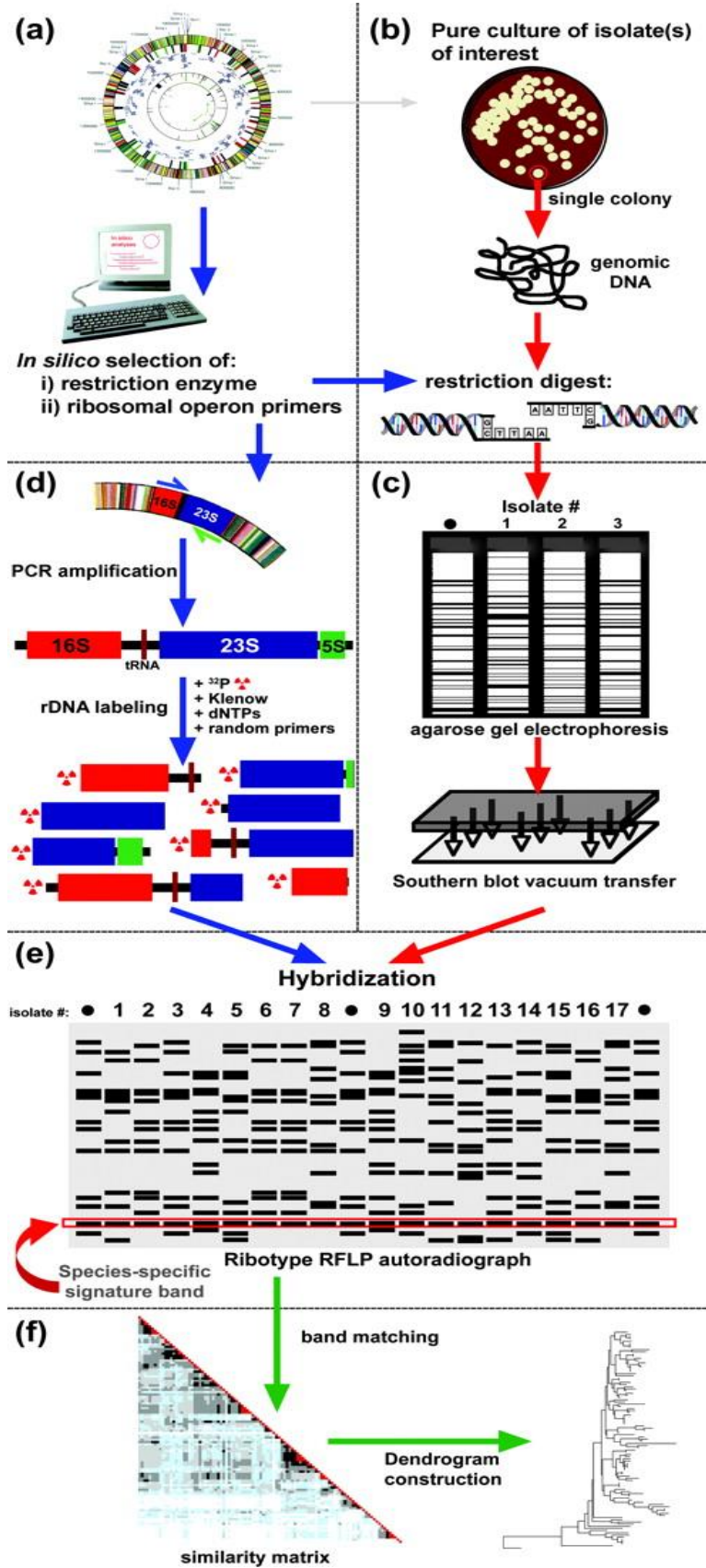


Figura 4. Ribotipado (Fuente: Bouchet *et al.*, 2008).

3.3.2.3. Anàlisis de los fragmentos concretos del genoma

Identificación mediante MLST

La técnica de *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) o también llamada secuenciación multilocus propuesta por Maiden *et al.* (1998), se basa en el análisis de las secuencias parciales de una serie de genes conservados o *housekeeping* (Yu *et al.*, 2018; De Las Rivas *et al.*, 2004). Los genes conservados o genes *housekeeping* son genes que codifican las proteínas que realizan funciones básicas para mantener la célula viva, es por ello que tienen una tasa de mutación muy baja y son unos indicadores muy fiables para poder diferenciar organismos. Por lo que pequeñas variaciones en la secuencia de estos genes permiten diferenciar claramente las distintas cepas de la misma especie.

Gracias a esta técnica, es posible conocer la cepa concreta de *Oenococcus oeni* permitiendo detectar pequeñas mutaciones que muestran una tasa de evolución y una diversidad neutral (Bridier *et al.*, 2010).

El funcionamiento de MLST consiste en amplificar mediante PCR la muestra de ADN deseada (para ello hay que hacer un protocolo de aislamiento de ADN y purificación del mismo), posteriormente hay que secuenciar el ADN amplificado y por última hay que hacer un análisis *multilocus* de las secuencias mediante la comparación de los perfiles alélicos (Hunter, 1990).

En el estudio de González *et al.* (2013) se utilizaron ocho genes *housekeeping* para la técnica MLST. Se aislaron 30 muestras de cepas de *Oenococcus oeni*, de las cuales se organizaron dentro de la misma cepa aquellas cepas que presentaban una similitud del 100% y se localizaron dieciséis cepas distintas. Mediante los resultados obtenidos por la caracterización de los ocho genes *housekeeping* se determinaron de tres a ocho alelos.

La gran ventaja de la técnica MLST es su alta reproducibilidad (González *et al.*, 2013) y posee una alta discriminación para comparar bacterias de la misma especie pero procedentes de diferentes cepas mediante la secuenciación de los nucleótidos (De las Rivas *et al.*, 2007).

6. CONCLUSIONES

Oenococcus oeni es la bacteria más utilizada en la vinificación por las características que presenta y es necesario su seguimiento durante la vinificación.

Las técnicas moleculares permiten distinguir diferentes especies y diferentes cepas de *Oenococcus oeni* que tiene una gran importancia en las bodegas para seleccionar los cultivos iniciadores y poder asegurar su población durante la fermentación maloláctica y evitar el desarrollo de otras bacterias que causen alteraciones en los vinos.

Para la identificación a nivel de especie, se prefiere la técnica FISH frente a las técnicas PCR específica y 16S-ARDRA para controlar la evolución de poblaciones microbianas en el mosto o durante la fermentación maloláctica en el vino, siendo una técnica económica y buena para su aplicación real.

Recientemente, la técnica MLST es la más precisa para la secuenciación de genes comparada con la técnica RFLP y la ribotipia, debido a que presentaba una mayor discriminación entre las cepas de la misma especie de *Oenococcus oeni*.

A la hora de elegir la técnica se deberá tener en cuenta si se busca una técnica para la identificación a nivel de especie o de cepa, el tiempo disponible y la inversión económica.

Actualmente, la técnica más utilizada en los centros de investigación y laboratorios de referencia es la PCR a tiempo real debido a su alta sensibilidad, especificidad y su capacidad de realizar correcciones durante la fermentación maloláctica en el vino, aunque su precio sea elevado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALEIXANDRE, J. L. E ÁLVAREZ, I. 2003. *Tecnología enológica*. Ed. Vértice. Valencia. 446pp.
- ALEXANDRE, H., COSTELLO, P., REMIZE, F., GUZZO, J. AND GUILLOUX-BENATIER, M. 2004. *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine current knowledge and perspectives. *Intern. Journal of Food Microb.* 93. 141-154.
- ALONSO, S. A. 2013. Utilización de la DGGE para la caracterización de la microbiota asociada a la manzana de sidra. TFM. Universidad de Oviedo. Oviedo.
- ANCIN-AZPILICUETA, C., GONZALES-MARCO, A. AND JIMENEZ-MORENO, N. 2008. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 48. 257-275.
- ARENA, M.E. AND DE NADRA, M.C.M. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology.* 90. 158-162.
- BAE, S, Fleet, G. H. AND Heard, G. M. 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 100. 712-727.
- BECH-TERKILSEN, S., WESTMAN, J.O., SWIEGERS, J. H. and SIEGUMFELDT, H. 2020. *Oenococcus oeni*, a species born and moulded in wine: a critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses. *Australian Grape and Wine research.* 26 (3). 188-206.
- BERGEY, H., HARRISON, C., BREED, S., HAMMER, W. AND HUNTOON. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* 2009, 1984-1989. Georgia, USA. 640pp.
- BERTANI, G., SAVO SARDARO, M., NEVIANI, E. AND LAZZI, C. 2019. AFLP protocol comparison for microbial diversity fingerprinting. *Journal of Applied Genetics.* 217-223.
- BETTERIDGE, A., GARBIN, P., AND JIRANEK, V. 2015. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology.* 33. 547–553.
- BILHÉRE, E., LUCAS, P.M., CLAISSE, O. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2009. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two sub-populations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology.* 75. 1291–1300.
- BLASCO, L. 2009. Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación. Universidad de Valencia. Valencia.
- BLASCO, L., FERRER, S. Y PARDO, I. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225. 115-123.
- BOUCHET, V., HOUT, H. AND GOLDSTEIN, R. 2008. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clinical Microbiology Reviews.* 262–273.
- BOUIX, M. AND GHORBAL, S. 2015. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* 193. 139–146.
- BRIDIER, J., CLAISSE, O., COTON, M., COTON, E. AND LONVAUD.FUNEL, A. 2010 Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 76. 23. 7754–7764.
- CAMPBELL.SILLS, H., EL KHOURY, M., FAVIER, M., ROMANO, A., BIASIOLI, F., SPANO, G., SHERMAN, D.J., BOUCHEZ, O., COTON, E., COTON, M., OKADA,

- S., TANAKA, N., DOLS-LAFARGUE, M. AND LUCAS, P. M. (2015) Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome Biology and Evolution*. 7. 1506–1518.
- CAPPELLO, M.S., ZAPPAROLI, G., LOGRIECO, A., BARTOWSKY, E.J. 2017. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 243. 16-27.
- CHEN, W. Lactic Acid Bacteria Omics and Functional Evaluation. 2019. Ed. Science Press Beijing. Beijing. 408pp.
- CLAISSE, O. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2012. Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 30. 340–347.
- COCOLIN, L., DOLIC, P. Y RANTSIOU, K. 2010. Métodos independientes y dependientes de cultivo para estudiar y caracterizar la ecología microbiana en la fermentación vinica. *Revista Acenología*. 120.
- COCOLIN. L., MANZANO, M., CANTONI, C. AND COMI, G. 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. Isolated from fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction temperature gradient gel electrophoresis. *Let. Appl. Microbiol.* 30. 126-129.
- COSTELLO, P.J., SIEBERT, T.E., SOLOMON, M.R., BARTOWSKY, E.J., 2013. Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 114. 797-806.
- CRUZ-COKE, R. 1999. The history of genetics in Latin American countries during the twentieth century. *Rev. méd. Chile* v.127. 12.
- CRUZ, E. 2015. Estudio de la diversidad y evaluación de las relaciones fenotipo-genotipo para la búsqueda de cepas malolácticas de *Oenococcus oeni*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia.
- CRUZ, E., POVEDA, M., ALBERTO, R., FERRER, S. Y PARDO, I. 2017. Exploring the biodiversity of two groups of *Oenococcus oeni* isolated from grape musts and wines: Are they equally diverse? *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 1–10.
- DANIEL, P., DE WAELE, E. y HALLET, J. 1993. Optimization of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38. 639-641.
- DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A. AND MUNOZ, R. 2004. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70. 7210-7219.
- DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. 2004. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 70. 7210-7219.
- DE LAS RIVAS, C. Y MOTA, M. 2019. Bacterias Anaerobias - Resumen Microbiología. StuDocu. 355.
- DI MARTINO, C., TESTA, B., LETIZIA, F., LORIZZO, M., LOMBARDI, J., LANIRO, M., DI RENZO, STROLLO, D., COPPOLA, R. 2020. Effect of exogenous proline on the ethanolic tolerance and malolactic performance of *Oenococcus oeni*. *J Food Sci Technol.* 1.
- DICKS, L. M. T., DELLAGLIO, F. AND COLLINS, M.D. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* gen., comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45. 395-39.

- ENDO, A. AND OKADA, S. 2005. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis. *J Biosci Bioeng* 99. 216–221.
- ERCOLINI, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56. 297-314.
- FERNÁNDEZ, R. 2015. Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas. Universidad de La Rioja. La Rioja.
- FERRER, S. 2003. Objetivo: *Oenococcus oeni*. *Revista Acenología*.
- FISCHER, S. G., Y LERMAN, L.S. 1983. Length-independent separation of ADN restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16. 191-200.
- FLEET, G., LAFON-LAFOURCADE, S. AND RIBÉREAU-GAYON, P. 1984. Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 1034-1038.
- FOX, G. E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R. B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T. A., Wolfe, R., BALCH W. E., TANNER, R. S., MAGRUM, L. J., ZABLEN, L. B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS. B. J., STAHL, D.A., LUEHRSEN, K. R., CHEN, K. N. AND WOESE, C. R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science.* 209. 457–463.
- FRANQUÉS, J., ARAQUE, I., REGUANT, C AND BORDONS, A. 2018. Identificación de *Oenococcus oeni* autóctonos de uvas y vino del Priorat y su selección para la vinificación. Universidad Rovira y Virgili.
- GARCIA, J. 2011. *Enología avanzada*. Ed. Vértice. Málaga. 312pp.
- GARIJO, P., LÓPEZ, R., SANTMARÍA, P., OCÓN, E., OLARTE, C., SANZ, S., & GUTIÉRREZ, A.R. 2011. Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *Eur. Food Res. Technol.* 233. 359-365.
- GIANNINO, M. L., MARZOTTO, M., DELLAGIO, F. AND FELIGINI, M. 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 130. 188–195.
- GINDREAU, E., JOYEUX, A., DE REVEL, G., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A. 1997. Evaluation de l'établissement des levains malolactiques au sein de la microflore bactérienne indigène. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 31. 197-202.
- GODÁLOVÁ, Z., KRAKOVÁ, L., PUSKÁROVÁ, A., BUCKOVÁ, M., KUČHTA, T., PIKNOVÁ, L., & PANGALLO, D. (2016). Bacterial consortia at different wine fermentation phases of two typical Central European grape varieties: Blaufränkisch (Frankovka modrá) and Grüner Veltline (Veltlínske zelené). *Int. J. Food Microbiol.* 217. 110-116.
- GONZÁLEZ, L. A, SANTAMARÍA, P., LÓPEZ, R. Y LÓPEZ, I. A. 2013. *Oenococcus oeni* strain typification by combination of Multilocus. *Food Microbiology.* 38. 295-302.
- GRIMALDI, A., BARTOWSKY, E., JIRANEK, V., 2005b. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 105. 233-244.
- GUZZO J., JOBIN, M. P., DELMAS, F., FPRTIER, L. C., GARMYN, D., TOURDOT-MARÉCHAL, R., LEE, B., DIVIÈS, C. 2000. Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *Int J Food Microbiol.* 55(1-3). 27-31.
- HERNÁNDEZ, T, ESTRELLA, I., PÉREZ-GORDO, M., ALEGRÍA, E.G., TENORIO, C., RUIZ-LARREA, F. AND MORENO-ARRIBA, M.V. 2007. Contribution of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the non-anthocyanin phenolic

- composition of red wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 55. 5260-5266.
- HIRSCHHÄUSER, S., FRÖHLICH, J., GNEIPEL, A., SCHÖNIG, I. AND KÖNIG, H. 2005. Fast protocols for the 5S rADN and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters* 244. 165–171.
- HOLT, S.M. AND COTE, G.L. 1998. Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic ADN protocol. *Applied and Environmental Microbiology*. 64. 3096-3098.
- HUNTER, P.R., 1990. Reproducibility and indexes of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 28 (9). 1903-1905.
- IBEAS, J.I., LOZANO, I., PERDIGONES, F. and JIMENEZ, J. 1996. Detection of Dekkera-Brettanomyces strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology* 62. 998–1003.
- KARP, G. 2014. Biología celular y molecular conceptos y experimentos. 8e. Editorial: McGraw-Hill Interamericana editores. 865 pp.
- KUNENE, N., GEORNARAS, I., VON HOLY, A. AND HASTINGS, J. 2000. Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Mar. 66(3). 1084–1092.
- KUNKEE, R.E. 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiology Review*. 88. 55– 72.
- LERM, E., ENGELBRECHT AND L., DU TOIT, M., 2010. Malolactic fermentation: the ABCs of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31.186-212.
- LIU, F. H., LIN, G. H., GAO, G., QIN, B.Q., ZHANG, J.S., ZHAO, G. P., ZHOU ZH AND SHEN, J. H. 2009. Bacterial and archaeal assemblages in sediments of a large shallow freshwater lake, Lake Taihu, as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Appl Microbiol* 106 (3). 1022–1032.
- LIABACA, C. 2015. Identificación de microbiota bacteriana relacionada con procesos enológicos en Chile. Universidad Rovira y Virgili. Tarragona.
- LONVAUD-FUNEL, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton. Leeuw.* 76 (1-4): 317-31.
- LONVAUD-FUNEL, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 199. 9-13.
- LONVAUD-FUNEL, A., BITEAU, N. AND FREMAUX, C. 1989. Identification of *Leuconostoc oenos* with ADN probes. *Sciences del Aliments*. 9. 533-540.
- LÓPEZ, I. 2004. Detección y control por técnicas de la biología molecular de bacterias lácticas autóctonas responsables de la fermentación maloláctica en vinos D.O.Ca Rioja. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. La Rioja.
- LUBBS, D.C., VESTER, B. M., FASTINGER, N.D., SWANSON, K.S. 2009. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *J Anim Physiol Anim Nutr* 93(1). 113–121.
- MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D., FEAVERS, I., ACHTMAN, M. AND SPRATT, B. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95. 3140-3145.
- MARCOBAL, A., MORENO-ARRIBAS, M.V., POLO, M.C., MARTIN-ÁLVAREZ, P.J. 2005. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an

- HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*. 38. 387-394.
- MATTHEWS, A., GRIMALDI, A., WALKER, M., BARTOWSKY, E., GARBIN, P., JIRANEK, V., 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70. 5715-5731.
- MEROTH, C. B., WALTER, J., HERTEL, C., BRANDT, M. J. AND HAMMES, W. P. 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69. 475-482.
- MESA, J., RODRÍGUEZ, M. Y ALEGRE, M. 2004. Tolerancia de *Oenococcus oeni* RS1 a las condiciones de estrés del vino. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 4, Nº4. 278-282.
- MESAS, J.M. Y ALEGRE, M.T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. The role of the microorganisms in winemaking o Papel dos microorganismos na elaboracion do vino. *Ciencia y tecnología de los alimentos. Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 2, No. 4. 174-183.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2006. Encuentro Enológico. Fundación para la cultura del vino. Madrid. 137pp.
- MORENO-ARRIBAS, V. Y POLO, C. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer. New York. 728pp.
- MOZZI, F., RAYA, R., GRACIELA, M. AND VIGNOLO, M. 2015. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley Blackwell. New Jersey. U.S.A. 374pp.
- NAOURI, P., CHAGNAUD, P., ARNAUD, A. AND GALZY, P. 1990. Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278. *J. Basic Microbiol.* 30. 577-585.
- NAVARRO, E., SIMONET, P., NORMAND, P. Y BARDIN, R. 1992. Characterisation of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology*. 157. 107-115.
- NEILAN, B.A. 1995. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic ADN PCR. *Applied and Environment Microbiol.* 61. 2286-2291.
- OIV-OENO, 2012. RESOLUTION. 409-2012.
- OLGUÍN, N., 2007. Factores que afectan el desarrollo de *Oenococcus oeni* y nuevas herramientas genéticas para la selección de cepas. Tesis Doctoral. Universidad Rovira y Virgili. Tarragona.
- OLGUÍN, N., ESTEVE, B., ROZÈS, N, MAS, A., GUILLAMÓN, J.M. 2006. Técnicas independientes de cultivo para la identificación y cuantificación de microorganismos en el vino. *Tecnología del Vino*. 34. 62-67.
- PARDO, I., RODAS, A., FERRER, S. 1998. Study on populations dynamics of *Oenococcus oeni* in wine by using RFLP-PFGE. *Les entretiens scientifiques Lallemand* 6. 93-96.
- PETERSSON, A., DOMIG, K.J, NAGEL, P., ZOLLITSCH, W., HAGMÜLLER, W. AND KNEIFELD, W. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal lactobacilli and bifidobacteria of pigs during a feeding trial. *Arch Anim Nutr* 63(2). 112-126.
- PINZANI, P., BONCIANI, L., PAZZAGLI, M., ORLANDO, C., GUERRINI, S. AND GRANCHI, L. 2003. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 38. 118-124.

- PONNUSAMY, L., XU, N., STAV G., WESSON, D. M., SCHAL, C. AND APPERSON, C. S. 2008. Diversity of bacterial communities in container habitats of mosquitoes. *Microb Ecol* 56(4). 593–603.
- POZO, M. A., PARDO, I., FERRER, S. AND MORENO, M. V. 2009. Molecular approaches for the identification and characterization of oenological lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8 (17). 3995-4001.
- PRÉVOST, H., CAVIN, J., LAMOUREUX, M. Y DIVIÈS, C. 1995. Plasmid and chromosome characterization of *Leuconostoc oenos* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43-47.
- PUGLISI, E., FRAGOULIS, G., RICCIUTI, P., CAPPÀ, F., SPACCINI, R., PICCOLO, A., TREVISAN, M., CRECCHIO, C. 2009. Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere* 77(6). 829–837.
- QI, Y., LIU, D. AND YU, H. 2020. Identification and Characterization of the Small Heat Shock Protein Hsp20 from *Oenococcus oeni* SD-2a. *Curr Microbiol*. 77. 3595–3602.
- RANTSIUO, K., COMI, G., AND COCOLIN, L. 2004. The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacteria population dynamics during food fermentations. *Food Microbiol*. 21. 481–487.
- REGUANT, C. Y BORDONS, A. 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 2003. 95. 344–353.
- REGUANT, C., CARRETÉ, R. Y BORDONS, A. 2003. Nuevo método de PCR (Multiplex RAPD) para diferenciar cepas de *Oenococcus oeni*. *ACE: Revista de enología*, ISSN-e 1697-4123. N.º. 36.
- RENOUF, V., CLAISSE, O. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 75. 149-164.
- RENOUF, V., CLAISSE, O., MIOT-SERTIER, C. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2006. LAB evolution during winemaking: use of the rpoB gene as target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol*. 23. 136-145.
- RENOUF, V., CLAISSE, O., MIOT-SERTIER, C. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2006. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol*. 23. 136–145.
- RENOUF, V., STREHAIANO, P. AND LONVAUD-FUNEL, A. 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *Int. Vine Wine Sci.*, 41: 51-61.
- RODAS, A. M., FERRER, S., PARDO, I. 2003. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. *System. Appl. Microbiol*. 26. 412–422.
- RODAS, A. M., FERRER, S., PARDO, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 55, 197-207.
- RODRIGUEZ, M. 2011. Empleo de la técnica hibridación *in situ* fluorescente para visualizar microorganismos. *Scielo*. 43 (3). 307-316.
- ROZÈS, N., MAS BARÓN, A., TORIJA, M.J., REGUANT, C., POBLET, M., GUILLAMÓN, J., BORDONS, A. AND BELTRAN, G. Seguimiento e identificación de los microorganismos presentes durante la elaboración de los vinos. *Dialnet* 2. 2000. 95-100.
- RUIZ, P., IZQUIERDO, P.M., SESENA, S., AND PALOP, M.L. 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol*. 25. 942–948.

- RUIZ, P., SESEÑA, S., IZQUIERDO, P. AND LLANOS, M. 2010. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Appl Microbiol Biotechnol.* 86. 1555–1562.
- SAGUIR, F.M., LOTO, I. E., MATURANO, C., DE NADRA, M.C., 2009. Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. *Int. J. Wine Res.* 1. 175-185.
- SATO, H., YANAGIDA, F. SHINOHARA, T., YOKOTSUKA, K. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *J. Biosc. Bioeng.* 90. 335-337.
- SAVELKOUL, P. H., AARTS, H. J., DE HAAS, J., DIJKSHOORN, L., DUIM, B., OTSEN, M., RADEMAKER, J. L., SCHOOLS, L., AND LENSTRA, J. A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of clinical microbiology.* 37(10). 3083–3091.
- SPANO, G., LONVAUD-FUNEL, A., CLAISSE, O. AND MASSA, S. 2007. In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr. Microbiol.*, 54. 9-13.
- SPANO, G., LONVAUD-FUNEL, A., CLAISSE, O. AND MAZZA, S. 2007. In Vivo PCR-DGGE Analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Populations in Red Wine. *Cur. Microbiol.* 54. 9–13.
- SUÁREZ, J.A. Y MORATA, A. 2015. Levaduras para vinificación en tinto. AMV ediciones. Madrid. 225pp.
- TANTIKACHORNKIAT, M., MORGAN S.C., LEPITRE, M., CLIFF, M. A. AND DURALL, D. M. 2020. Durall Yeast and bacterial inoculation practices influence the microbial communities of barrel-fermented Chardonnay wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 26 -3. 279-289.
- TORIJA, M. J. 2002. Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis doctoral. Universidad Rovira y Virgili. Tarragona.
- URWIN, R. AND MAIDEN, M.C.J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11. 479–487.
- VANEECHOUTTE, M., ROSSAU, R., DE VOS, P., GILLIS, M., JANSSEN, D., PAEPE, N., DE ROUCK, A., FIERS, T., CLAEYS, G., KERSTERS, K. 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal ADN-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93. 227-234.
- VAUGHAN, R. H., AND TECHLISTCHEFF, A. 1957. Studies of the malolactic fermentation of California table wines. I. An introduction to the problem. *Am. J. Enol. Vitic.* 8. 74-79.
- VÁZQUEZ, H. Y DACOSTA, O. 2006. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Investigación y Tecnología VIII.* 4. 249-259.
- VERNILE, A., GIAMMANCO, G. AND MASSA, S., 2009. PFGE: importance in food quality. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 1 (3). 248-251.
- VIGENTINI, I., PICOZZI, C., TIRELLI, A., GIUGNI, A., AND FOSCHINO, R. 2009. Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *Int. J. Food Microbiol.* 136. 123–128.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J. y KUIPER, M. 1995. AFLP: a new technique for ADN fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 23. 4407–1444.

- WILSON, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 3741– 3751.
- YANG, K., LIU, M., YANG, J., WEI, X., FAN, M., AND ZHANG, G., 2020. Physiological and proteomic responses of freeze-dried *Oenococcus oeni* SD-2a with ethanol-acclimations. *National Natural Science Foundation of China. Lebensmittel-Wissenschaft. Technologie*, v. 129.
- YU D, SHI K, WEN X, XIE F, WANG T, LIU S, HE L. Evidence of the genetic diversity and clonal population structure of *Oenococcus oeni* strains isolated from different wine-making regions of China. *J. Microbiol.* 56. 556-564.
- ZAPPAROLI, G., REGUANT, C., BORDONS, A., TORRIANI, S., AND DELLAGLIO, F. 2000. Genomic ADN Fingerprinting of *Oenococcus oeni* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic ADN-PCR. *Current Microbiol.* 40. 351-355.
- ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S., PESENTE, P. C. AND DELLAGLIO, F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted *primers* for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*. 27. 243–246.
- ZAVALETA, A., MARTÍNEZ, A. Y RODRÍGUEZ, F. 1997. Intraspecific Genetic Diversity of *Oenococcus oeni* as Derived from ADN Fingerprinting and Sequence Analyses. *Applied and Environ. Microb.* 1261-1267.