



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Tecnología de Alimentos

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES DE FRUTAS

TESIS DOCTORAL

**Presentada por:
Liliana Mabel Gerard**

**Dirigida por:
Dra. María Mercedes Ferreyra
Dra. María Inmaculada Álvarez Cano**

Diciembre 2015

Dedico esta Tesis a mis padres.

Ellos me enseñaron que para lograr los objetivos planteados es necesario dedicarse con esfuerzo, sacrificio, constancia y fuerza de voluntad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a las instituciones que me brindaron la posibilidad de continuar mi formación profesional a través del Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria: la Universidad Nacional de Entre Ríos y la Universidad Politécnica de Valencia.

A la Facultad de Ciencias de la Alimentación que me brindó las instalaciones y las herramientas para que pudiera desarrollar mi Tesis Doctoral.

A mis Directoras: la Dra. María Mercedes Ferreyra; muchas gracias Mercedes por tu dedicación y paciencia, tus consejos y tus enseñanzas; y a la Dra. María Inmaculada Álvarez Cano, que a la distancia, dedicó horas de su descanso para leer y corregir capítulo a capítulo esta Tesis.

A mi familia: a mi esposo Maximiliano y mis hijos: Giuliana, Ignacio y Gino, que a pesar de todo, me alentaron a seguir adelante. Siempre repetían: Shhh! mamá está estudiando....

A mi amiga y compañera de ruta Cristina, siempre dispuesta a escuchar, a dar consejos, siempre con la palabra justa. Recorrimos este largo camino juntas, nos acompañamos en los logros y en los fracasos, compartimos muchas alegrías y también "bajones", esperando "la otra vida al final del camino". ¡Gracias Cris por ser mi amiga!

A vos Petty, mi mamá del corazón, siempre disponible para cuidar mis hijos, tus nietos. Te ocupaste de ellos, cuando realicé los cursos del Doctorado, cuando viajé para aprender un poco más de Técnicas de PCR, cuando trabajé más de la cuenta y cuando pasé horas de los fines de semana trabajando en la computadora.

Al Dr. Gustavo Teira, que en su carácter de Vicedecano de la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos, brindó los

medios económicos a través de la Secretaría Administrativa, para que Viviana Rodriguez me ayude con las Técnicas Moleculares.

A vos, Viviana Rodriguez, que me sacaste de la meseta donde me encontraba y me enseñaste todo aquello que no está en los libros. Siempre estaré agradecida de tus enseñanzas, de tus consejos, simplemente GRACIAS!!!!

A la Dra. María del Carmen Schwab que hizo posible, a través de su gestión, que el laboratorio de Microbiología y Biotecnología contara con un termociclador, aparato fundamental para el desarrollo de esta tesis. Además, estuvo siempre atenta a las necesidades, siempre con la frase adecuada y solucionando muchas cosas; siempre sacó de la galera un programa informático, para realizar el tratamiento de los datos y resolver exitosamente los problemas planteados.

Al Dr. Osvaldo Tisocco, que me facilitó el manual del liofilizador y me guió en la utilización del mismo.

Al Dr. Juan Manuel Castagnini, gracias por tus consejos acerca del uso de un programa para la Bibliografía, se hizo mucho más fácil el trabajo.

A todos los becarios que han pasado por el Laboratorio de Microbiología, que con su trabajo diario, permitieron alcanzar los resultados mostrados en esta tesis.

A todo el personal de la Facultad de Ciencias de la Alimentación que siempre estuvieron dispuestos a ayudar, cuando se presentaron problemas con las instalaciones o los equipos.

A mis compañeros del Programa de Doctorado, de los que recibí palabras de alientos, cuando las cosas no funcionaban.

A todos ¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

Las bacterias del ácido acético (BAA) pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae*; están incluidas en el grupo de las α -Proteobacterias. Son microorganismos Gram-negativos, de forma elipsoidal o cilíndrica que pueden encontrarse aislados, en parejas o formando cadenas. Son móviles por flagelación polar o períttrica. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas. Poseen metabolismo aeróbico estricto, con el oxígeno como aceptor final de electrones. En los últimos 25 años, la taxonomía de las BAA ha sufrido muchos cambios de acuerdo con el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas moleculares. Además, el uso de nuevas herramientas bioinformáticas y el acceso libre a las bases de datos de secuencias, han hecho posible la revisión de la clasificación de las BAA y consecuentemente, el reordenamiento de géneros y especies conocidas como así también la identificación de nuevos géneros y especies. Actualmente, la familia *Acetobacteraceae* está compuesta por 19 géneros y 72 especies. Es conocida la habilidad de las BAA para oxidar azúcares y alcoholes, obteniéndose como producto final una acumulación de ácidos orgánicos, capacidad que es aprovechada en la industria de alimentos para la elaboración de vinagres de vinos y de frutas. El vinagre ha sido considerado como uno de los productos de calidad más baja de los alimentos fermentados, sin embargo, en la actualidad, se ha convertido en uno de los aderezos más versátil y es muy utilizado en la cocina gourmet.

La presente Tesis Doctoral planteó el aislamiento e identificación de BAA a partir de la flora epifítica de arándanos y frutas cítricas cultivadas en la región de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina), con el fin de encontrar las más adecuadas para ser utilizadas en procesos biotecnológicos, tales como el vinagre.

Se aislaron 36 BAA a partir de estas frutas mediante técnicas de enriquecimiento y aislamiento en placas. Los caldos de enriquecimiento que contenían etanol y ácido acético permitieron recuperar el mayor número de

BAA, ya que dichos componentes favorecen el crecimiento de las mismas. Del jugo fermentado de las frutas cítricas se obtuvo un mayor número de BAA respecto del jugo fresco o la cáscara, debido a la presencia de etanol, el que actuó como agente de selección para estos microorganismos alcohol-resistentes. Las pruebas bioquímicas permitieron diferenciar las bacterias a nivel de género. Se reconocieron 6 géneros: 13 aislados fueron identificados como *Acetobacter*, 5 como *Gluconobacter*, 7 como *Asaia*, 5 como *Acidomonas*, 1 como *Gluconacetobacter* y 5 como *Saccharibacter*.

Posteriormente, se identificaron a nivel de especie aquellas bacterias (géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*) que podrían ser utilizadas para el desarrollo de un cultivo iniciador apto para la bioxidación de mostos alcohólicos obtenidos a partir de estos frutos, con el fin de obtener vinagres. Para esto, se emplearon técnicas moleculares, tales como PCR-RFLP del gen 16S y PCR-RFLP del espaciador intergénico 16S-23S. Con la primera, se identificaron las 16 BAA estudiadas. Los aislados C7, C8, A80, A160 y A180 fueron identificados como *G. frateurii*, los aislados C1, C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210 como *A. pasteurianus*, los aislados A50 y A140 como *A. tropicalis* y el aislado C9 como *A. syzygii*. La técnica PCR-RFLP del 16S-23S confirmó las identificaciones realizadas con el 16S; sin embargo, C1 mostró un patrón de restricción que no se correspondía con la primera identificación realizada. Esta discrepancia fue resuelta por la secuenciación parcial del gen 16S, que confirmó los resultados obtenidos por PCR-RFLP.

Se estudió la dinámica de crecimiento y la habilidad de las BAA aisladas para producir ácido acético, con el fin de elegir las más aptas para la acetificación de mostos de frutas. El crecimiento se evaluó con distintas concentraciones de etanol y ácido acético teniendo en cuenta que valores altos de los recuentos celulares (10^9 células/mL) son considerados esenciales para los inóculos destinados al arranque en la producción de vinagre, a fin de lograr una fase de latencia corta y de esta manera disminuir tiempos de proceso. En cuanto a la habilidad para producir ácido acético, se ensayaron tres concentraciones de etanol, 4%, 6% y 8%, evidenciándose que los cultivos,

identificados como *A. pasteurianus* (A210 y C1) *A. syzygii* (C9) y *G. frateurii* (A80) podrían ser utilizados como inóculo para la elaboración de vinagres, por poseer una alta capacidad de producción de ácido acético cuando la concentración de etanol es de 4% y 6% v/v. Valores de etanol, por encima del 8% v/v no podrían ser utilizados, debido a su efecto inhibitor en el crecimiento y en la producción de ácido acético.

Finalmente, se estudió la metodología más apropiada de conservación de los cultivos que permitan el mantenimiento de su pureza y actividad a lo largo del tiempo. Las BAA podrían ser liofilizadas con manitol 20% p/v o leche en polvo 10% p/v, ya que estos lioprotectores demostraron ser efectivos para mantener la viabilidad de las células. Sin embargo, éstos no permitieron mantener la producción de ácido acético a partir de etanol. El presente estudio demostró que el glicerol (20% v/v) y el manitol (20% p/v) pueden ser utilizados como crioprotectores en el proceso de congelación, ya que no sólo protegen a las BAA, manteniendo su viabilidad, sino que también ayudan a conservar las propiedades funcionales de las mismas, tales como su capacidad de crecer y producir ácido acético en mostos alcohólicos.

ABSTRACT

Acetic acid bacteria (AAB) belong to the *Acetobacteriaceae* family, within the α -Proteobacteria class. These Gram-negative elliptical or cylindrical microorganisms occur in isolation, in pairs or in chains. They have polar flagellar or peritrichous motility. They are non-spore forming, catalase positive and oxidase negative. They have an obligate aerobic metabolism, with oxygen as the terminal electron acceptor. BAA taxonomy has changed in the last 25 years due to development and application of new molecule techniques. New bioinformatics tools and open access to data bases of sequences have also enabled revision of AAB classification and the update of known genera and species as well as the identification of new ones. Currently, the *Acetobacteraceae* family includes 19 genera and 72 species. Sugar and alcohol oxidising ability result in an accumulation of organic acids as final products, which is widely used in the food industry to produce vinegar from wine and fruits. Vinegar has been considered a very poor quality fermented food. However, it has currently become a highly versatile dressing, extensively used in gourmet cuisine.

The objective of this thesis was to isolate and identify AAB in blueberry and citrus epiphyt flora from plants grown in the Salto Grande region (Entre Ríos, Argentina) in order to detect the most suitable bacteria for biotechnological processes such as vinegar.

36 AAB were isolated from these fruits using enrichment techniques and plate isolation. Enrichment broths containing ethanol and acetic acid enabled the maximum recovery of AAB due to the fact that these components promote their growth. Fermented juice yielded a larger number of AAB compared to fresh fruit or peel, due to ethanol occurrence as it is an alcohol-resistant microorganisms selecting agent. Biochemical tests allowed bacteria differentiation at genus level. Six were identified: 13 bacteria isolates were identified as *Acetobacter*, 5 as *Gluconobacter*, 7 as *Asaia*, 5 as *Acidomonas*, 1 as *Gluconacetobacter* and 5 as *Saccharibacter*.

Subsequently, those bacteria (*Acetobacter*, *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* genera) that could be used for the development of a suitable starter culture for the bio-oxidation of musts alcoholics obtained from these fruits, in order to obtain vinegars, were identified to specie level. Molecular techniques, such as RFLP-PCR of the 16S rDNA and RFLP-PCR of the 16S-23S rDNA intergenic spacer, were utilised. The former enabled the identification of the 16 AAB under study. C7, C8, A80, A160 and A180 isolates were identified as *G. frateurii*, C1, C2, C3, C4, C5, C6, A70 and A210 isolates as *A. pasteurianus*, A50 and A140 isolates as *A. tropicalis* and C9 isolate as *A. syzygii*. 16S-23S PCR-RFLP technique validated identifications performed using 16S; however, C1 showed a different restriction pattern from the first identification. Genus 16S partial sequencing solved this discrepancy.

Growth dynamics and acetic acid production capacity were studied in the isolates in order to determine the most suitable ones to acetify fruits musts. Growth was assessed in different ethanol and acetic acid concentrations as high cell count values (10^9 cells/mL) are essential for the inoculum to start vinegar production, in order to achieve a short lag phase and therefore reduce process times. Three ethanol concentrations were assayed (4%, 6% and 8%) to study acetic acid production capacity. Results showed that cultures identified as *A. pasteurianus* (A210 and C1), *A. syzygii* (C9) and *G. frateurii* (A80) could be used as inoculum to produce vinegars, due to their high acetic acid production capacity when ethanol concentration values are 4% and 6% v/v. Ethanol values above 8% v/v inhibit acetic acid production and growth, therefore they cannot be used.

Finally, the most suitable culture preservation method was determined to maintain purity and activity through time. AAB may be lyophilised with 20% w/v mannitol or 10% w/v dried milk since these lyoprotective agents demonstrated they are effective at maintaining cells viability. Nevertheless, these agents did not allow acetic acid production from ethanol. This study has demonstrated that glycerol (20% v/v) and mannitol (20% w/v) can be used as cryoprotective agents during freezing since they not only protect AAB and maintain bacteria

viability but also help to preserve the functional properties, such as its ability to grow and produce acetic acid in alcoholic musts.

RESUM

Els bacteris de l'àcid acètic (BAA) pertanyen a la família *Acetobacteriaceae* i estan incloses en el grup dels α -Proteobacteris. Són microorganismes gram-negatius, de forma elipsoidal p cilíndrica que pot trobar-se aïllada, emparellada o formant cadenes. Són mòbils per flagel·lació polar o períttrica. Presenten activitat catalasa positiva, oxidasa negativa i no formen endospores. Posseeixen metabolisme aeròbic estricte, amb l'oxigen com aceptor final d'electrons. En els últims 25 anys, la taxonomia dels BAA ha patit molts canvis d'acord amb el desenvolupament i aplicació de noves tècniques moleculars. A més, l'ús de noves eines bioinformàtiques i l'accés lliure a les bases de dades de seqüències, han fet possible la revisió de la classificació dels BAA i conseqüentment, el reordenament de gèneres i espècies conegudes com també la identificació de nous gèneres i espècies. Actualment, la família *Acetobacteraceae* està composta per 19 gèneres i 72 espècies. Es coneguda l'habilitat dels BAA per a oxidar sucres i alcohols, obtenint-se com a producte final una acumulació d'àcids orgànics, capacitat aprofitada en la indústria dels aliments per a l'elaboració de vinagres de vins i fruites. El vinagre ha sigut considerat com un dels productes de qualitat més baixa dels aliments fermentats, tanmateix, en l'actualitat, s'ha convertit en un dels adobs més versàtils i es molt utilitzat en la cuina gourmet.

La present Tesi Doctoral planteja l'aïllament i identificació dels BAA a partir de la flora epifítica dels nabius i cítrics cultivats en la regió de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina), amb la finalitat de trobar les més adequades per ser utilitzades en processos biotecnològics, tals com el vinagre.

S'aïllaren 36 BAA a partir d'aquestes fruites mitjançant tècniques d'enriquiment i aïllament en plaques. Els brous d'enriquiment que contenien E i AA permeteren recuperar el major numero de BAA, ja que tals components afavorien el seu creixement. Del suc fermentat dels cítrics es va obtenir un major nombre de BAA respecte del suc fresc o la pell, degut a la presència de E, que actuà com agent de selecció per a aquestos microorganismes alcohol-

resistents. Les proves bioquímiques permeteren diferenciar els bacteris a nivell de gènere. Es reconegueren 6 gèneres: 13 aïllats foren identificats com *Acetobacter*, 5 com *Gluconobacter*, 7 com *Asaja*, 5 com *Acidomonas*, 1 com *Gluconacetobacter* i 5 com *Saccharibacter*.

Posteriorment, s'identificaren a nivell d'espècie aquells bacteris que podrien ser utilitzats per al desenvolupament d'un cultiu indicadorstarter apte per a la biooxidació de mostos alcohòlics obtinguts a partir d'aquests fruits, amb la finalitat d'obtenir vinagres de fruites (gèneres *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconacetobacter*). Amb aquesta finalitat, s'utilitzaren tècniques moleculars, com PCR-RFLP del gen 16S i PCR-RFLP de l'espaciador intergènic 16S-23S. Amb la primera, s'identificaren els 16 BAA estudiats. La tècnica PCR-RFLP del 16S-23S va confirmar les identificacions realitzades amb el 16S, tanmateix C1 va mostrar un patró de restricció que no es corresponia amb la primera identificació realitzada. Aquesta discrepància fou resolta per la seqüenciació parcial de gen 16S, que va confirmar el resultat obtingut per PCR-RFLP. Els aïllats C7, C8, A80, A160 i A180 foren identificats com *G. frateurii*, els aïllats C1, C2, C3, C4, C5, C6, A70 i A210 com *A. pasteurianus*, els aïllats A50 i A140 com *A. tropicalis* i l'aïllat C9 com *A. syzygii*.

S' estudià la dinàmica de creixement i la habilitat per produir AA dels BAA aïllades, amb la finalitat de triar les més aptes per a l'acetificació de mostos de fruites. El creixement s'evaluà amb diferents concentracions de E i AA tenint en compte que els valors alts dels recomptes cel·lulars (10^9 cèl·lules/mL) són considerats essencials per als inòculs destinats a l'arrancada en la producció del vinagre, amb la fi d'aconseguir una fase de latència curta i d'aquesta manera disminuir temps de processos. Quan a l'habilitat per a produir AA, s'assajaren tres concentracions d'etanol, 4%, 6% i 8% v/v, evidenciant-se que els cultius, identificats com *A. pasteurianus* (A210 i C1) *A. syzygii* (C9) i *G. frateurii* (A80) podrien ser utilitzats com inòcul per a l'elaboració de vinagres, per posseir una alta capacitat de producció de AA quan la concentració de E és

de 4% i 6% v/v. Valores de E, per damunt del 8% v/v, no podrien ser utilitzats degut al seu efecte inhibidor en el creixement i en la producció de AA.

Finalment, es va estudiar la metodologia més apropiada de conservació dels cultius que permeten el manteniment de la seua puresa i activitat al llarg del temps. Els BAA podrien ser liofilitzats amb manitol 20% p/v o llet en pols 10% p/v, ja que aquestos lioprotectors demostraren ser efectius per a mantenir la viabilitat de les cèl·lules. Tanmateix, aquestos no permeteren mantenir la producció de AA a partir de E. El present estudi va demostrar que el glicerol (20% v/v) i el manitol (20% p/v) poden ser utilitzats com crioprotectors en el procés de congelació, ja que no sols protegeixen els BAA, mantenint la seua viabilitat, sinò que també ajuda a conservar les seues propietats funcionals, tals com la seua capacitat de produir AA en mostos alcohòlics.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	V
RESUM	IX
ÍNDICE GENERAL	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XX
ÍNDICE DE TABLAS	XXIV
ABREVIATURAS	XXVI

CAPÍTULO Nº 1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO	2
1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	2
1.1.2 TAXONOMIA.....	2
1.1.3 METABOLISMO	7
1.1.3.1 METABOLISMO DEL ETANOL	12
1.1.3.2 METABOLISMO DE OTROS ALCOHOLES	15
1.1.3.3 METABOLISMO DE LOS AZÚCARES	16
1.1.3.4 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS	17
1.1.3.5 METOBOLISMO DEL NITROGENO	17
1.1.4 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA	18
1.1.4.1 PRODUCCIÓN DE CELULOSA	19
1.1.4.2 PRODUCCIÓN DE SORBOSA Y DE VITAMINA C.....	20
1.1.4.3 PRODUCCIÓN DE VINAGRES	21
1.2 VINAGRE.....	21
1.2.1 MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE VINAGRES	22
1.2.1.1 MÉTODO EN SUPERFICIE	23
1.2.1.2 MÉTODO SCHÜTZENBACH.....	23
1.2.1.3 CULTIVO SUMERGIDO	24
1.2.2 LAS BAA EN LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES.....	24

1.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE....	25
1.2.3.1 TEMPERATURA	26
1.2.3.2 CONCENTRACION DE ETANOL.....	26
1.2.3.3 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO	26
1.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO Nº 2 OBJETIVOS. PLAN DE TRABAJO	48
2.1 JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DE LA TESIS DOCTORAL	49
2.2 OBJETIVOS	50
2.2.1. OBJETIVO GENERAL	50
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
2.3 PLAN DE TRABAJO.....	51
CAPÍTULO Nº 3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO .	53
3.1. INTRODUCCIÓN	54
3.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO	54
3.1.2 CUANTIFICACION	57
3.1.3. FRUTAS DE LA REGIÓN DE SALTO GRANDE.....	58
3.1.3.1 CÍTRICOS.....	59
3.1.3.2 ARÁNDANOS	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
3.2.1 MUESTREO.....	62
3.2.2 MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO Y DE AISLAMIENTO.....	63
3.2.3 PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONFIRMAR FAMILIA <i>Acetobacteriaceae</i>	65
3.2.3.1 MORFOLOGÍA CELULAR Y MOVILIDAD.....	65
3.2.3.2 CATALASA.....	65
3.2.3.3 CITOCROMO C OXIDASA.....	65
3.2.4 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS O ESTUDIO FENOTÍPICO	66

3.2.4.1 OXIDACIÓN DE ACETATO Y LACTATO.....	66
3.2.4.2 FORMACIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE AZÚCARES Y ALCOHOLES .	66
3.2.4.3 CRECIMIENTO A 30±1 °C, 37±1 °C Y 40±1 °C	66
3.2.4.4 CRECIMIENTO A PH 3,5; 4,0 Y 4,5.....	67
3.2.4.5 CRECIMIENTO EN AGAR MANITOL.....	67
3.2.4.6 CRECIMIENTO EN AGAR GLUTAMATO.....	67
3.2.4.7 CRECIMIENTO CON METANOL COMO FUENTE DE C	68
3.2.4.8 CRECIMIENTO EN 0,35% (V/V) DE ÁCIDO ACÉTICO.....	68
3.2.4.9 FORMACIÓN DE DIHIDROXIACETONA A PARTIR DE GLICEROL...	68
3.2.4.10 CRECIMIENTO EN 1% KNO ₃	69
3.2.4.11 CRECIMIENTO EN 3% DE NaCl	69
3.2.4.12 CRECIMIENTO EN 30% DE GLUCOSA.....	69
3.2.4.13 OXIDACIÓN DE ETANOL A CO ₂	69
3.2.4.14 DETERMINACIÓN DE QUINONAS	70
3.2.5 CONSERVACIÓN	71
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.3.1 AISLAMIENTO DE BAA A PARTIR DE ARÁNDANOS.....	71
3.3.2 AISLAMIENTO DE BAA A PARTIR DE FRUTAS CÍTRICAS.....	73
3.3.3 PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONFIRMAR FAMILIA <i>Acetobacteriaceae</i>	75
3.3.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS.....	78
3.4 CONCLUSIONES	91
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CAPÍTULO Nº 4 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN	109
4.1 INTRODUCCIÓN	110
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
4.2.1 BACTERIAS	113
4.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS.....	113
4.2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS	114

4.2.4 VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN.....	114
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
4.3.1 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE BAA.....	114
4.3.2 INFLUENCIA DEL ETANOL	123
4.3.3 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ACÉTICO.....	125
4.3.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO	127
4.3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ACETIFICACIÓN	131
4.4 CONCLUSIONES	136
4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

CAPÍTULO Nº 5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

POR PCR-RFLP.....	144
5.1. INTRODUCCIÓN	145
5.1.1 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES	145
5.1.2 TÉCNICAS BASADAS EN PCR	146
5.1.2.1 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE	147
PCR-RFLP DEL GEN 16 ARNr	147
PCR-RFLP DEL ESPACIADOR INTERGÉNICO 16S-23S ARNr	147
PCR-RFLP DEL 16S-23S-5S ARNr	148
PCR-AFLP.....	148
ANÁLISIS DEL GEN QUE CODIFICA LA SUBUNIDAD I DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH) DEPENDIENDO LA QUINONA DE PIRROLOQUINOLINA (PQQ-ADH).....	149
PCR-DGGE	149
PCR EN TIEMPO REAL (PCR-RT).....	149
5.1.2.2 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE CEPAS	150
PCR-RAPD (AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN).	150

ERIC-PCR (SECUENCIAS CONCENSO REPETITIVAS INTRAGÉNICAS DE ENTEROBACTERIAS) Y PCR-REP (SECUENCIAS REPETITIVAS PALINDRÓMICAS EXTRAGÉNICAS)	150
(GTG) ₅ -PCR.....	151
5.1.3 SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	151
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	152
5.2.1 BACTERIAS	152
5.2.2 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	152
5.2.3 CONDICIONES DE PCR.....	153
5.2.4 PROGRAMAS DE PCR	154
5.2.5 ELECTROFORESIS.....	155
5.2.6 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	156
5.2.7 ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	157
5.2.8 TRATAMIENTO DE DATOS PARA EL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	157
5.2.9. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S	158
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
5.3.1 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	159
5.3.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PCR.....	160
5.3.3 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	162
5.3.3.1 ENZIMA <i>Rsa</i> I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S.....	163
5.3.3.4 ENZIMA <i>Msp</i> I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S.....	164
5.3.3.3 ENZIMA <i>Tru</i> 9I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S.....	166
5.3.3.4 ENZIMA <i>Hae</i> III PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S.....	167
5.3.3.5 ENZIMA <i>Alu</i> I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S	169
5.3.3.6 ENZIMA <i>Taq</i> I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S	171
5.3.3.7 ENZIMA <i>Cfo</i> I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S	173
5.3.4 ANÁLISIS PCR-RFLP 16S ADN.....	174
5.3.5 ANÁLISIS PCR- RFLP 16S-23S ADN.....	178
5.3.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	183
5.3.7 SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S	186
5.4 CONCLUSIONES	191

5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....192

CAPÍTULO Nº 6 LIOFILIZACIÓN Y CONGELACIÓN: ALTERNATIVAS PARA CONSERVAR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO.....203

6.1 INTRODUCCIÓN204

6.1.1 CULTIVOS MICROBIANOS204

6.1.2 CONSERVACIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS.....204

6.1.3 CONSERVACIÓN DE BAA206

6.1.3.1 CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN207

6.1.3.2 CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN.....209

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS211

6.2.1 BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO211

6.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS, LIOPROTECTORES, CRIOPROTECTORES211

6.2.3 DESCRIPCIÓN DE LAS EXPERIENCIAS DE LABORATORIO211

6.2.4 MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN212

6.2.4.1 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO214

6.2.4.2 CONTROL DE PUREZA Y VIABILIDAD214

6.2.5 MÉTODO DE CONGELACIÓN.....215

6.2.5.1 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO215

6.2.5.2 CONTROL DE VIABILIDAD.....215

6.2.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO POST TRATAMIENTO216

6.2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS217

6.2.8 VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN.....217

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN218

6.3.1 EFECTO DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS.....219

6.3.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO225

6.3.3 EFECTO DEL PROCESO DE CONGELACIÓN EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS.....228

6.3.4 COMPARACIÓN ENTRE LA CONSERVACIÓN DE BAA POR LIOFILIZACIÓN Y POR CONGELACIÓN231

6.3.5 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN POST TRATAMIENTO DE LIOFILIZACIÓN Y CONGELACIÓN	232
6.4 CONCLUSIONES	235
6.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	236
CAPÍTULO Nº7 DISCUSIÓN GENERAL.....	242
7.1 DISCUSIÓN GENERAL	243
7.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	253

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1.1 Reacciones de oxidación de alcoholes y azúcares en la membrana citoplasmática.....	13
Figura 1.2 Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del glioxilato vía acetil-CoA.....	15
Figura 3.1. Frutas regionales: naranjas y arándanos.....	59
Figura 3.2 Colonias de BAA desarrolladas en agar GEY-CaCO ₃	75
Figura 3.3 Bacterias del ácido acético con tinción de Gram, 1000X.....	77
Figura 4.1 Curvas de crecimiento de los aislados A50, A70, A80 y A140.....	116
Figura 4.2 Curva de crecimiento de los aislados A160, A180, A210 y C1.....	117
Figura 4.3 Curva de crecimiento de los aislados C2, C3, C4 y C5.....	118
Figura 4.4 Curva de crecimiento de los aislados C6, C7, C8 y C9.....	119
Figura 4.5 Aislados que alcanzaron un recuento mayor a 5×10^8 células/mL.....	123
Figura 4.6 Producción de AA de los aislados A50, A70, A80 y A140.....	127
Figura 4.7 Producción de AA de los aislados A160, A180, A210 y C1.....	128
Figura 4.8 Producción de AA de los aislados C2, C3, C4 y C5.....	129
Figura 4.9 Producción de AA de los aislados C6, C7, C8 y C9.....	130
Figura 4.10 Velocidades de acetificación para el aislado C1.....	132
Figura 4.11 Velocidades de acetificación para el aislado C2.....	132
Figura 4.12 Velocidades de acetificación para el aislado C4.....	133
Figura 4.13 Velocidades de acetificación para el aislado C5.....	133

Figura 4.14 Velocidades de acetificación para el aislado C9.....	134
Figura 4.15 Velocidades de acetificación para el aislado A80.....	134
Figura 4.16 Velocidades de acetificación para el aislado A210.....	135
Figura 5.1 Esquema de los genes que codifican para ARNr en procariontes y sus regiones espaciadoras ITS.	148
Figura 5.2 ADN extraído utilizando Kit MoBio en gel de agarosa 1% y 0,5µg/mL bromuro de etidio.....	159
Figura 5.3 Amplificación del gen ribosomal 16S con iniciadores P1 y P2 en las bacterias aisladas de arándanos.....	160
Figura 5.4 Amplificación del gen ribosomal 16S con iniciadores P1 y P2 en bacterias aisladas de frutas cítricas.....	161
Figura 5.5 Amplificación del espaciador intergénico 16S-23S con cebadores P3 y P4 en bacterias aisladas de arándanos.....	161
Figura 5.6 Amplificación del espaciador intergénico 16-23S con cebadores P3 y P4 en bacterias aisladas de naranjas.....	162
Figura 5.7 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>RsaI</i>	163
Figura 5.8 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>RsaI</i>	164
Figura 5.9 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>MspI</i>	165
Figura 5.10 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>MspI</i>	165
Figura 5.11. Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>Tru9I</i>	166

Figura 5.12 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>Tru9I</i>	167
Figura 5.13 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>HaeIII</i>	168
Figura 5.14 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>HaeIII</i>	168
Figura 5.15 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>AluI</i>	170
Figura 5.16 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>AluI</i>	170
Figura 5.17 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>TaqI</i>	172
Figura 5.18 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>TaqI</i>	172
Figura 5.19 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>CfoI</i>	173
Figura 5.20 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción <i>CfoI</i>	174
Figura 5.21 Dendograma de similitud de bacterias aisladas y cepas de referencia respecto de patrones de restricción del gen ribosomal 16S con las enzimas de restricción <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , <i>TaqI</i> , <i>CfoI</i> y <i>Tru9I</i>	184
Figura 5.22 Relación filogenética de los aislados de BAA con cepas de referencia tomadas del GenBank.....	190

Figura 6.1 Esquema de los procesos de liofilización y congelación.....	212
Figura 6.2 Equipo de liofilización Heto Drywinner provisto de manifold.....	213
Figura 6.3 Cultivos de BAA liofilizados en ampollas de vidrio.....	219
Figura 6.4 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con manitol 20% y conservados a 5 °C.....	222
Figura 6.5 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con leche descremada en polvo al 10% y conservados a 5 °C.....	223
Figura 6.6 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con manitol 20% y conservados a temperatura ambiente.....	226
Figura 6.7 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con leche descremada en polvo al 10% y conservados a temperatura ambiente.....	226
Figura 6.8 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 congelados con manitol 20% y conservados a -20 °C.....	230
Figura 6.9 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 congelados con glicerol 20% y conservados a -20 °C.....	230
Figura 6.10 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 con los distintos tratamientos transcurridos los 180 días de almacenamiento.....	231
Figura N° 6.11 Curvas de crecimiento de los aislados C1, C9 y A210 en caldo RAE a 30 °C y 4% E - 0,5% AA.....	233
Figura 6.12 Velocidades de acetificación para los aislados C1, C9 y A210 en caldo RAE a 30 °C y 4% E - 0,5% A luego de 72 horas; antes de someterlos a los diferentes tratamientos y luego de los mismos, transcurrido los 180 días de almacenamiento.....	234

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1.1 Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas.....	8
Tabla 3.1 Variación de la participación relativa de los destinos de fruta de Entre Ríos 2009/13.....	60
Tabla 3.2 Composición de Caldos de Enriquecimiento.....	64
Tabla 3.3 Origen de BAA aisladas a partir arándanos.....	72
Tabla 3.4 Origen de BAA aisladas a partir de frutas cítricas.....	74
Tabla 3.5 Origen, tamaño y agrupación de las BAA aisladas de arándanos.....	76
Tabla 3.6 Origen, tamaño y agrupación de las BAA aisladas de frutas cítricas.....	77
Tabla 3.7 Características bioquímicas de las bacterias aisladas.....	79
Tabla 3.8 Géneros aislados de acuerdo al caldo de enriquecimiento.....	88
Tabla 4.1 Velocidad de acetificación y recuento celular.....	120
Tabla 5.1 Secuencia y número de bases de los cebadores utilizados para la amplificación del gen ADN 16S.....	153
Tabla 5.2 Secuencia y número de bases de los cebadores utilizados para la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S ADNr.....	154
Tabla 5.3 Condiciones de amplificación del gen ribosomal 16S.....	154
Tabla 5.4 Condiciones de amplificación del espacio intergénico 16S-23S ADNr.....	155
Tabla 5.5 Enzimas de restricción utilizadas en los ensayos.....	156
Tabla 5.6 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>RsaI</i> para las BAA.....	163
Tabla 5.7 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la	166

enzima <i>MspI</i> para las BAA.....	
Tabla 5.8 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>Tru9I</i> para las cepas aisladas en el laboratorio.....	167
Tabla 5.9 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>HaeIII</i> para las BAA.....	169
Tabla 5.10 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>AluI</i> para las BAA.....	170
Tabla 5.11 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>TaqI</i> para las BAA.....	171
Tabla 5.12 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima <i>CfoI</i> para las BAA.....	174
Tabla 5.13 Clasificación de BAA aisladas de acuerdo al análisis de PCR-RFLP 16S ADNr y PCR-RFLP del ITS 16S-23S	176
Tabla 5.14 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima <i>MspI</i> para las BAA.....	180
Tabla 5.15 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima <i>HaeIII</i> para las BAA.....	181
Tabla 5.16 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima <i>TaqI</i> para las BAA.....	181
Tabla 5.17 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima <i>RsaI</i> para las BAA.....	182
Tabla 5.18 BAA identificadas por secuenciación parcial del 16S utilizando el programa BLAST del NCBI.....	187
Tabla 6.1 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de liofilización de BAA y almacenamiento a 5 °C.....	220
Tabla 6.2 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de liofilización de BAA y almacenamiento a temperatura ambiente.....	221
Tabla 6.3 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de congelación y almacenamiento de BAA.....	229

ABREVIATURAS

- A.* *Acetobacter*
- A bacterias aisladas de arándanos
- AA ácido acético
- Ac.* *Acidomonas*
- ADH alcohol deshidrogenasa
- AE ácido acético, etanol
- ALDH acetaldehído deshidrogenasa
- APAMA Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina
- As.* *Asaia*
- BAA bacterias del ácido acético
- C bacterias aisladas de cítricos
- C citosina
- CB celulosa bacteriana
- DO densidad óptica
- E etanol
- EEA Estación Experimental Agropecuaria
- G.* *Gluconobacter*
- G guanina
- Ga.* *Gluconacetobacter*
- GEY glucosa, etanol, extracto de levadura
- GYC glucosa, extracto de levadura, peptona
- INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- Ko.* *Komagataiebacter*
- p pico

pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
Q10	ubiquinona 10
Q9	ubiquinona 9
RC	recuento celular
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>Sa.</i>	<i>Saccharibacter</i>
<i>S.</i>	<i>Swaminathania</i>
VA	velocidad de acetificación
YPM	extracto de levadura, peptona, manitol

CAPÍTULO N° 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las bacterias del ácido acético (BAA) pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* y están incluidas en el grupo de las α -Proteobacterias. Son microorganismos Gram-negativos o Gram-variables, de forma elipsoidal o cilíndrica que pueden encontrarse aislados, en parejas o formando cadenas. Su tamaño oscila entre 0,4 a 1 μm de ancho y de 0,8 a 4,5 μm de longitud. Son móviles por flagelación polar o peritrica. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas. Poseen metabolismo aeróbico estricto, con el oxígeno como aceptor final de electrones (Sievers y Swings 2005; Mandigan et al. 2009; Komagata et al. 2014).

La temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 30 $^{\circ}\text{C}$, aunque también pueden desarrollarse a temperaturas más altas; algunas especies lo hacen a 38 – 40 $^{\circ}\text{C}$ (Saeki et al. 1997; Ndoye et al. 2006) y otras, a temperaturas más bajas (10 $^{\circ}\text{C}$), aunque su crecimiento es muy débil (Joyeux et al. 1984). El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6; sin embargo, la mayoría de las cepas pueden crecer a pH inferiores a 5 (Cleenwerck y De Vos 2008), incluso a pH 2 – 2,2 (Du Toit y Pretorius 2002), pero la tolerancia a los bajos pH depende de otros parámetros, como la concentración de etanol y la disponibilidad de oxígeno (Gullo y Giudici, 2008).

1.1.2 TAXONOMIA

El científico Christiaan Hendrik Persoon fue el primer taxónomo de este grupo de bacterias a las cuales, en el año 1822 denominó *Mycoderma*. Posteriormente, Pasteur en 1868, realizó un estudio sistemático de la fermentación acética, demostrando que el ácido acético se formaba a partir de la oxidación del etanol, y que si esta oxidación continuaba por más tiempo se

convertía en CO₂ y H₂O. Además, reconoció que la "madre del vinagre" era una masa de microorganismos vivos que producían dicha fermentación y que ésta no era posible si no estaba presente el *Micodema acetii*, confirmando las observaciones realizadas por Persoon (Polo Sanchez y Sanchez Luengo 1991). Más tarde, en el año 1879, Hansen observó que la flora microbiana responsable de convertir el etanol en ácido acético no era pura, sino que estaba formada por varias especies de bacterias. Es por eso, que en el año 1894 las clasificó en función de la aparición de una película en los medios líquidos y su reacción con yodo. Vissert Hooft, en el año 1925, realizó la primera propuesta de clasificación basada en criterios bioquímicos y fisiológicos (González 2005).

El nombre "*Acetobacter*" fue sugerido en 1898 por Beijerinck, mientras que Asai en los años 1934 y 1935, estudiando bacterias que viven en las frutas, propuso el nombre "*Gluconobacter*" para aquellas que tienen una limitada capacidad para oxidar etanol a ácido acético, pero una fuerte capacidad de oxidar la glucosa a ácido glucónico y las diferenció en estos aspectos del género *Acetobacter* (Yamada y Yukphan 2008). Sin embargo, el nuevo nombre propuesto por Asai no fue muy conocido en los países occidentales, ya que sus estudios fueron publicados en idioma japonés (Buchanan 1970). Posteriormente, Leifson en 1954, desconociendo los trabajos de Asai, propuso el género "*Acetomonas*" para las bacterias que poseen flagelos polares y no oxidan el acetato a CO₂ y H₂O y "*Acetobacter*" para las que poseen flagelos peritricos y tienen la capacidad de oxidar el ácido acético a CO₂ y H₂O. Las propuestas de dos nombres diferentes, "*Gluconobacter*" y "*Acetomonas*", para el mismo tipo de microorganismo crearon confusión en el ordenamiento de estas bacterias (Shimwell 1958; Carr y Shimwell 1961; Asai et al. 1964). Más tarde, De Ley en 1961, da prioridad al nombre *Gluconobacter* sobre "*Acetomonas*" y llama *Gluconobacter oxydans* a la especie conocida (Yamada y Yukphan 2008).

En 1950, Frateur propuso un sistema de clasificación del género *Acetobacter* en 4 grupos utilizando cinco criterios bioquímicos: producción de

catalasa, oxidación del acetato y lactato a CO₂ y H₂O, oxidación del glicerol a dihidroxiacetona, producción de ácido glucónico a partir de glucosa y capacidad de crecer en un medio con etanol como única fuente de carbono y en sales de amonio como única fuente de nitrógeno (medio de Hoyer). De esta manera, formó los grupos, sin valor taxonómico, *Peroxydans*, *Oxydans*, *Mesoxydans* y *Suboxydans*; el nombre de cada grupo aludía a la mayor o menor capacidad de oxidar el etanol a ácido acético (Carr y Shimwell 1961; Polo Sanchez y Sanchez-Luengo 1991; González 2005).

En la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology aparecen dos géneros *Acetobacter* (móvil por flagelos peritricos o no móvil, oxida el acetato y lactato a CO₂ y H₂O) y *Gluconobacter* (móvil por flagelos polares o no móvil, no oxida el acetato y lactato a CO₂ y H₂O). Sin embargo, el género *Gluconobacter* está dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, mientras el género *Acetobacter* no se asigna a ninguna familia (Cleenwerck y De Vos 2008). Posteriormente, basándose en los resultados de hibridación ADN - ARNr, Gillis y De Ley en 1980, propusieron reagrupar ambos géneros en la misma familia *Acetobacteraceae* (Kerstens et al. 2006). El Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, en su novena edición (1984) ha recogido esta propuesta, además incluye entre las claves taxonómicas algunas pruebas moleculares como la comparación de ácidos grasos, la electroforesis de proteínas soluble, el % de G+C y la hibridación ADN-ADN. Yamada y Kondo (1984) dividieron el género *Acetobacter* en dos subgéneros diferenciándolos por el sistema de ubiquinonas. Así, el subgénero *Acetobacter* fue caracterizado por poseer ubiquinona Q-9, mientras que en el subgénero *Gluconoacetobacter* se reconoció ubiquinona Q-10. Sin embargo, esta clasificación no fue reconocida (Yamada y Yukphan 2008).

En los últimos 25 años, la taxonomía de las BAA ha sufrido muchos cambios de acuerdo con el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías, como lo son las técnicas moleculares: hibridación ADN – ADN, porcentaje de G+C del genoma bacteriano, secuenciación automática de diferentes regiones del ADN,

etc. Además, el uso de nuevas herramientas bioinformáticas y el acceso libre a las bases de datos de secuencias, han hecho posible la revisión de la clasificación de las BAA y consecuentemente, el reordenamiento de géneros y especies conocidas como así también la identificación de nuevos géneros y especies, dando lugar a una re-clasificación continua (Yamada y Yukphan 2008; Cleenwerck y De Vos 2008; Gullo y Giudici 2009; Yukphan et al. 2009; Yukphan et al. 2011; SlapsaK et al. 2013; Yamada et al. 2012a; Yamada et al. 2012b; Yamada 2014). Hasta el año 1989, en la familia *Acetobacteraceae* sólo se conocían dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Fuentes-Ramírez et al. 2001; Lisdiyanti et al. 2003). En ese año Urakami (1989), propone la transferencia de la especie *Acetobacter methanolica* a un nuevo género: *Acidomonas*, en base a la secuencia 5S rRNA, llamando a la especie conocida como *Acidomonas methanolica*. Más tarde, Yamada y colaboradores propusieron elevar a género el subgénero *Gluconoacetobacter* (posteriormente llamado *Gluconacetobacter*), en base al análisis de la secuencia parcial de 16S de ADNr y comparación del sistema de ubiquinonas (Yamada et al. 1997; Navarro et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2000; Fuentes-Ramírez et al. 2001). Como consecuencia, las especies que poseían ubiquinona Q-10 incluidas en el género *Acetobacter* (*A*) fueron transferidas al nuevo género *Gluconacetobacter* (*Ga*). *A diazotrophicus*, *A. europaeus*, *A. hansenii*, *A. liquefaciens* y *A. xylinus* fueron reclasificadas como *Ga. diazotrophicus*, *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii*, *Ga. liquefaciens* y *Ga. xilinus*, respectivamente (Navarro y Komagata 1999; Lisdiyanti et al. 2000; Kersters et al. 2006).

Reconocidos investigadores estudiaron un gran número de bacterias del ácido acético que aislaron a partir de frutas, flores y alimentos fermentados de los países del sudeste asiático: Indonesia, Tailandia y Filipinas (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2000; Lisdiyanti et al. 2001; Lisdiyanti et al. 2002; Lisdiyanti et al. 2003). Estas investigaciones permitieron introducir dos nuevos géneros: *Asaia* (Yamada et al. 2000; Katsura et al. 2001) y *Kozakia* (Lisdiyanti et al. 2002; Lisdiyanti et al. 2003).

Posteriormente, se han aislado nuevos géneros: *Swaminathania* (Loganathan y Nair 2004), *Saccharibacter* (Jojima et al. 2004), *Neoasaia* (Yukphan et al. 2005), *Granulibacter* (Greenberg et al. 2006); *Tanticharoenia* (Yukphan et al. 2008), *Commensalibacter* (Roh et al. 2008), *Ameyamaea* (Yukphan et al. 2009), *Neokomagataea* (Yukphan et al. 2011), *Komagataeibacter* (Yamada et al. 2012a), *Endobacter* (Ramírez-Bahena et al. 2013), *Nguyenibacter* (Vu et al. 2013), *Swingsia* (Malimas et al. 2013) y *Bombella* (Li et al. 2015)

Además, desde 1998, nuevas especies y nuevas combinaciones han sido descritas en los géneros *Acetobacter*, *Asaia*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* (Boesch et al. 1998; Sokollek et al. 1998; Franke et al. 1999; Yamada 2000; Lisdiyanti et al. 2000; Lisdiyanti et al. 2001; Lisdiyanti et al. 2002; Schuller et al. 2000; Katsura et al. 2001; Fuentes-Ramírez et al. 2001; Cleenwerck et al. 2002; Katsura et al. 2002a; Tanasupawat et al. 2004; Yukphan et al. 2004a; Yukphan et al. 2004b; Cleenwerck et al. 2007; Cleenwerck et al. 2008).

Otro cambio importante en la taxonomía ha ocurrido recientemente cuando algunas especies del género *Gluconacetobacter* que fueron agrupadas en el nuevo género *Komagatabacter* (Yamada et al. 2012a). Sin embargo, el nuevo nombre del género y sus combinaciones no fueron reconocidos, ya que las propuestas no se hicieron de acuerdo a las recomendaciones incluidas en la regla 27 del Código Bacteriológico (Tindall et al. 2006). Por esto, Yamada y colaboradores, respetando dichas recomendaciones, propone un nuevo nombre a dicho género, lo llama *Komagataeibacter* (Yamada et al. 2012b).

Actualmente, la familia *Acetobacteraceae* está compuesta por 19 géneros (Komagata et al. 2014; Trček y Barja 2015) y 72 especies (Euzéby 1987), el listado de los mismos se encuentra en la Tabla 1.1. Dentro de la familia hay 12 géneros monotípicos: *Acidomonas* (*Ac*), *Kozakia* (*K*), *Swaminathania* (*S*), *Saccharibacter* (*Sa*), *Neoasaia* (*N*), *Granulibacter* (*Gr*), *Ameyamaea* (*Am*), *Swingsia* (*Sw*), *Nguyenibacter* (*Ng*), *Bombella* (*B*),

Commensalibacter (C) y *Endobacter (E)*, en los cuales se ha descrito una sola especie: *Ac. methanolica*, *K. baliensis*, *S. salitolerans*, *Sa. floricola*, *N. Chiangmaiensis*, *Gr. Bethesdensis*, *Am. Chiangmaiensis*, *Sw. samuiensis*, *Ng. Vanlangensis*, *B. intestini*, *C. intestini* y *E. medicaginis*. Los géneros *Gluconobacter (G)*, *Asaia (As)*, *Neokomagataea (Ne)* y *Tanticharoenia (T)* poseen 12, 8, 2 y 2 especies respectivamente. *Acetobacter (A)*, *Komagataeibacter (Ko)* y *Gluconacetobacter (Ga)*, con 23, 14, y 10 especies respectivamente son los géneros donde mayor diversidad de especies han sido descritas; y son las especies de estos géneros las que se utilizan en la producción de vinagre, particularmente, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. pomorum*, *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii*, *Ga. oboediens*, *Ga. intermedius*, *Ga. entanii* y *Ga. xylinus* (Sokollek et al. 1998; Gullo et al. 2006; Gullo et al. 2009; Wu et al. 2010; Fernández-Pérez et al. 2010; Wu et al. 2012; Fu et al. 2013; Malimas et al. 2013).

1.1.3 METABOLISMO

Las BAA tienen un metabolismo estrictamente aerobio, es decir que para su desarrollo necesitan disponer de oxígeno molecular, que actúa como aceptor final de electrones. Sin embargo, Drysdale y Fleet (1988) observaron que pueden sobrevivir en condiciones cercanas a la anaerobiosis, debido a la posibilidad de utilizar quinonas como aceptores terminales de electrones, en lugar del oxígeno. No obstante, en estas condiciones su crecimiento es muy limitado y cualquier proceso que permita aireación facilita su desarrollo.

La fuente de carbono (C) es también un factor importante para su desarrollo y dependiendo de ésta, las BAA utilizan diferentes rutas metabólicas, con intermediarios y productos finales distintos. Las BAA realizan una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es el etanol, se

produce ácido acético, de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen a estas bacterias (Raspor y Goranovic 2008).

Tabla 1.1 Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas. (Modificada de: Vinegars of the World. Gullo y Giudici 2009)

Géneros y Especies	Fuente	Referencia
<i>Acetobacter (A.)</i>		(Beijerinck 1898)
<i>A. aceti</i>	Vinagre	(Beijerinck 1898)
<i>A. cerevisiae</i>	Cerveza	(Cleenwerck et al. 2002)
<i>A. cibirongensis</i>	Guanábana	(Lisdiyanti et al. 2001)
<i>A. estunensis</i>	Sidra	(Lisdiyanti et al. 2000)
<i>A. farinalis</i>	Harina de arroz	(Tanasupawat et al. 2011a)
<i>A. ghanensis</i>	Cacao	(Cleenwerck et al. 2007)
<i>A. indonesiensis</i>	Frutas y flores	(Lisdiyanti et al. 2000)
<i>A. lambici</i>	Kefir	(Spitaels et al. 2014)
<i>A. lovaniensis</i>	Suelo	(Lisdiyanti et al. 2000)
<i>A. malorum</i>	Manzana	(Cleenwerck et al. 2002)
<i>A. nitrogenifigens</i>	Te kombucha	(Dutta y Gachhui 2006)
<i>A. oeni</i>	Vino	(Silva et al. 2006)
<i>A. okinawensis</i>	Caña de azúcar	(Iino et al. 2012a)
<i>A. orientalis</i>	Flor de canna	(Lisdiyanti et al. 2001)
<i>A. orleanensis</i>	Cerveza	(Lisdiyanti et al. 2000)
<i>A. papaya</i>	Papaya	(Iino et al. 2012a)
<i>A. pasteurianus</i>	Cerveza	(Beijerinck y Folpmers 1916)
<i>A. peroxydans</i>	Agua de zanja	(Visser't Hooft 1925)
<i>A. persicus</i>	Durazno	(Iino et al. 2012a)
<i>A. pomorum</i>	Vinagre industrial	(Sokollek et al. 1998)
<i>A. syzygii</i>	Zumo de manzana	(Lisdiyanti et al. 2001)
<i>A. tropicalis</i>	Coco	(Lisdiyanti et al. 2000)
<i>A. sicerae</i>	Cidra y kefir	(Li et al. 2014)

Tabla 1.1 (Continuación) Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas. (Modificada de: Vinegars of the World. Gullo y Giudici 2009)

Géneros y Especies	Fuente	Referencia
<i>Acidomonas (Ac.)</i>		(Urakami et al. 1989) (Yamashita et al. 2004)
<i>Ac. methanolica</i>	Fermentación de levaduras	(Urakami et al. 1989) (Yamashita et al. 2004)
<i>Ameyamaea (Am.)</i>		(Yukphan et al. 2009)
<i>Am. chiangmaiensis</i>	Flores de jengibre	(Yukphan et al. 2009)
<i>Asaia (As.)</i>		(Yamada et al. 2000)
<i>As. astilbes</i>	Flores de hortensia	(Suzuki et al. 2010)
<i>As. bogorensis</i>	Flores de orquídea	(Yamada et al. 2000)
<i>As. krungthepensis</i>	Flores de heliconia	(Yukphan et al. 2004a)
<i>As. platycodi</i>	Flores de Japón	(Suzuki et al. 2010)
<i>As. prunellae</i>	Planta curativa	(Suzuki et al. 2010)
<i>As. siamensis</i>	Flores tropicales	(Katsura et al. 2001)
<i>As. lannensis</i>	Flores de lycoris	(Malimas et al. 2008a)
<i>As. spathodeae</i>	Flores de tulipán	(Kommanee et al. 2010)
<i>Bombella (B.)</i>		(Li et al. 2015)
<i>B. intestini</i>	Intestino de abejorros	(Li et al. 2015)
<i>Commensalibacter (C.)</i>		(Roh et al. 2008)
<i>C. intestini</i>	Intestino de moscas	(Roh et al. 2008)
<i>Endobacter (E.)</i>		
<i>E. medicaginis</i>	Alfalfa	(Ramírez-Bahena et al.

Tabla 1.1 (Continuación) Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas. (Modificada de: Vinegars of the World. Gullo y Giudici 2009)

Géneros y Especies	Fuente	Referencia
<i>Gluconacetobacter (Ga.)</i>		
<i>Ga. aggeris</i>	Suelo	(Nishijima et al. 2013)
<i>Ga. asukensis</i>	Biofilm de murales de yeso	(Tazato et al. 2012)
<i>Ga. azotocaptans</i>	Planta de café	(Fuentes-Ramírez et al. 2001)
<i>Ga. diazotrophicus</i>	Caña de azúcar	(Gillis et al. 1989) (Yamada et al. 1997a)
<i>Ga. johannae</i>	Planta de café	(Fuentes-Ramírez et al. 2001)
<i>Ga. liquefaciens</i>	Fruta deshidratada	(Yamada et al. 1997a)
<i>Ga. sacchari</i>	Caña de azúcar	(Franke et al. 1999)
<i>Ga. takamatsuzukensis</i>	Suelo	(Nishijima et al. 2013)
<i>Ga. entanii</i>	Vinagre industrial	(Schuller et al. 2000)
<i>Ga. tumulicola</i>	Biofilm de murales de yeso	(Tazato et al. 2012)
<i>Gluconobacter (G.)</i>		
		(Asai 1935)
<i>G. albidus</i>	Flor de Dalia	(Yukphan et al. 2004b)
<i>G. cerinus</i>	Cereza	(Katsura et al. 2002)
<i>G. frateurii</i>	Frutilla	(Katsura et al. 2002)
<i>G. oxydans</i>	Cerveza	(Katsura et al. 2002)
<i>G. thailandicus</i>	Frutas	(Tanasupawat et al. 2004)
<i>G. japonicus</i>	chino	(Malimas et al. 2009)
<i>G. kondonii</i>	Frutilla	(Malimas et al. 2007)
<i>G. morbifer</i>	Intestino de moscas	(Roh et al. 2008)
<i>G. sphaericus</i>	Uva	(Malimas et al. 2008c)
<i>G. roseus</i>	Fruto del caqui	(Malimas et al. 2008b)
<i>G. uchimurae</i>	Tailandia	(Tanasupawat et al. 2011b)
<i>G. wancherniae</i>	Tailandia	(Yukphan et al. 2010)
<i>Granulibacter (Gr.)</i>		
		(Greenberg et al. 2006)
<i>Gr. bethesdensis</i>	Pacientes con granulomatosa	(Greenberg et al. 2006)

Tabla 1.1 (Continuación) Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas. (Modificada de: Vinegars of the World. Gullo y Giudici 2009)

Géneros y Especies	Fuente	Referencia
<i>Komagataeibacter (Ko)</i>		(Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. europaeus</i>	Vinagre industrial	(Yamada et al. 1997a) (Gossele et al. 1983)
<i>Ko. hansenii</i>	Vinagre	(Yamada et al. 1997a) (Yamada et al. 2012b) (Boesch et al. 1998)
<i>Ko. intermedius</i>	Té Kombucha	(Yamada 2000) (Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. kakiaceti</i>	Vinagre de Kaki	(Iino et al. 2012b; Yamada 2014)
<i>Ko. maltaceti</i>	Vinagre de malta	(Slapsak et al. 2013) (Yamada 2014)
<i>Ko. medellinensis</i>	Vinagre	(Castro et al. 2013) (Yamada 2014)
<i>Ko. nataicola</i>	Nata de coco	(Lisdiyanti et al. 2006)
<i>Ko. oboediens</i>	Vinagre de vino	(Sokollek et al. 1998b) (Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. rhaeticus</i>	Zumo de manzana	Dellaglio et al, 2005 (Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. saccharivorans</i>	Zumo de remolacha	(Lisdiyanti et al. 2006)
<i>Ko. sucrofermentans</i>	Vinagre	(Yamada et al. 2012b) Dellaglio et al, 2005
<i>Ko. swingsii</i>	Zumo de manzana	(Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. xylinus</i>	Bayas de montaña	(Yamada et al. 1997a) (Yamada et al. 2012b)
<i>Ko. kombuchae</i>	Té Kombucha	(Dutta y Gachhui 2006) (Yamada et al. 2012b)
<i>Kozakia (K)</i>		(Lisdiyanti et al. 2002)
<i>K. baliensis</i>	Azúcar moreno de	(Lisdiyanti et al. 2002)
<i>Neokomagataea (Ne)</i>		(Yukphan et al. 2011)
<i>Ne. thailandica</i>	Flores de Lantana	(Yukphan et al. 2011)
<i>Ne. tanensis</i>	Flores de arbusto medicinal	(Yukphan et al. 2011)

Tabla 1.1 (Continuación) Reciente organización de géneros y especies de BAA y fuente donde fueron aisladas. (Modificada de: Vinegars of the World. Gullo y Giudici 2009)

Géneros y Especies	Fuente	Referencia
<i>Neosaia</i> (N.)		(Yukphan et al. 2005)
<i>N. chiangmaiensis</i>	Flores de jengibre	(Yukphan et al. 2005)
<i>Nguyenibacter</i> (Ng.)		(Vu et al. 2013)
<i>Ng. vanlangensis</i>	Arroz	(Vu et al. 2013)
<i>Saccharibacter</i> (Sa.)		(Jojima et al. 2004)
<i>Sa. floricola</i>	Polen de flores	(Jojima et al. 2004)
<i>Swaminathania</i> (S.)		(Loganathan y Nair 2004)
<i>S. salitolerans</i>	Arroz	(Loganathan y Nair 2004)
<i>Swingsia</i> (Sw.)		(Malimas et al. 2013)
<i>Sw. samuiensis</i>	Flores de Tailandia	(Malimas et al. 2013)
<i>Tanticharoenia</i> (T.)		(Yukphan et al. 2008)
<i>T. sakaeratensis</i>	Tierra	(Yukphan et al. 2008)
<i>T. aidae</i>	Caña de azúcar	(Vu et al. 2015)

1.1.3.1 METABOLISMO DEL ETANOL

La oxidación del etanol a ácido acético es la característica más conocida de estas bacterias, la realizan todos los géneros de BAA excepto *Asaia* y *Saccharibacter* (Yamada et al. 2000; Jojima et al. 2004). Este proceso bioquímico consta de dos etapas: en la primera el etanol es transformado en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente, el acetaldehído se transforma en ácido acético por la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) (Figura 1.1). Ambas enzimas están ubicadas en la membrana

citoplasmática, con el centro activo hacia el exterior, por lo que su actividad se presenta principalmente en el espacio periplasmático y no en el interior de la célula (Saeki et al. 1997).

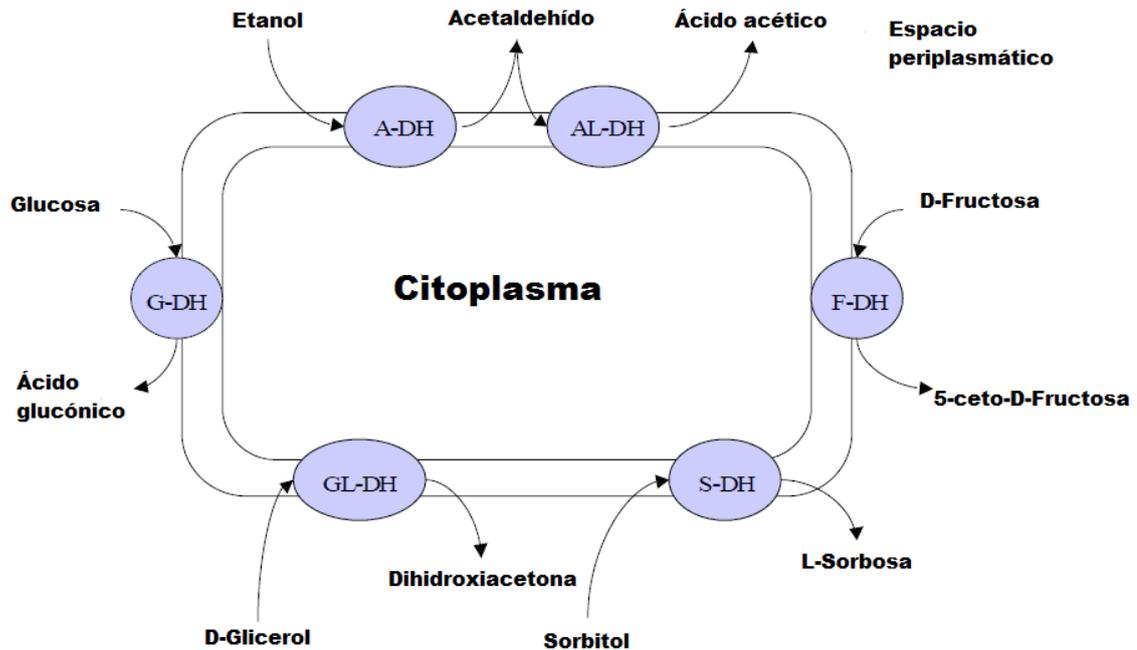


Figura 1.1 Reacciones de oxidación de alcoholes y azúcares en la membrana citoplasmática. G-DH: glucosa deshidrogenasa; A-DH: alcohol deshidrogenasa; AL-DH: aldehído deshidrogenasa; S-DH: sorbitol deshidrogenasa; F-DH: fructosa deshidrogenasa; GL-DH: glicerol deshidrogenasa.

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

La ALDH presenta un pH óptimo alrededor de 4 y 5, sin embargo, al igual que la ADH, es activa a pH inferior e independiente de NADP⁺. Las enzimas ADH y ALDH presentan distinta afinidad por el oxígeno, siendo más sensible la ALDH, lo que implica que si existe limitación de oxígeno disuelto en el medio se produce una acumulación de acetaldehído, que puede llegar a ser tóxico para estas bacterias. La ADLH también es más sensible a la concentración de etanol que la ADH y por tanto, medios con alto contenido alcohólico, pueden presentar una mayor acumulación de acetaldehído (Jara, 2009).

Los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* pueden oxidar completamente el ácido acético a CO₂ y H₂O a través del ciclo de Krebs (Yamada et al. 2012a) (Figura 1.2). Sin embargo, sólo sucede cuando no hay etanol, ya que esta oxidación es inhibida por la presencia de etanol en el medio y se cree que se trata de un cambio irreversible en su metabolismo y que por tanto, una vez que lo realizan ya no son capaces de oxidar etanol (De Ley et al. 1984; Drysdale y Fleet 1988; Raspor y Goranovic 2008). Debido a esto, es esencial durante la elaboración de vinagres, mantener una baja concentración de etanol (0,5 -1,0%) para evitar esta oxidación completa del ácido acético formado previamente (Mas et al. 2014). El género *Gluconobacter* no tiene funcional el ciclo de Krebs y por lo tanto, no es capaz de llevar a cabo la oxidación completa de ácido acético (Raspor y Goranovic 2008).

Algunas bacterias pueden producir altas concentraciones de ácido acético, hasta 150 g/L (Sievers et al. 1997; Lu et al. 1999), esta característica es muy importante para la industria del vinagre. La resistencia al ácido acético depende de la cepa (Nanba et al. 1984). La enzima citrato sintasa desempeña un papel clave en esta resistencia, debido a que ayuda a remover el ácido acético mediante su incorporación en los ciclos tricarboxílicos o del glioxilato, sin embargo este comportamiento sólo es posible cuando el etanol no está presente (Raspor y Goranovic 2008).

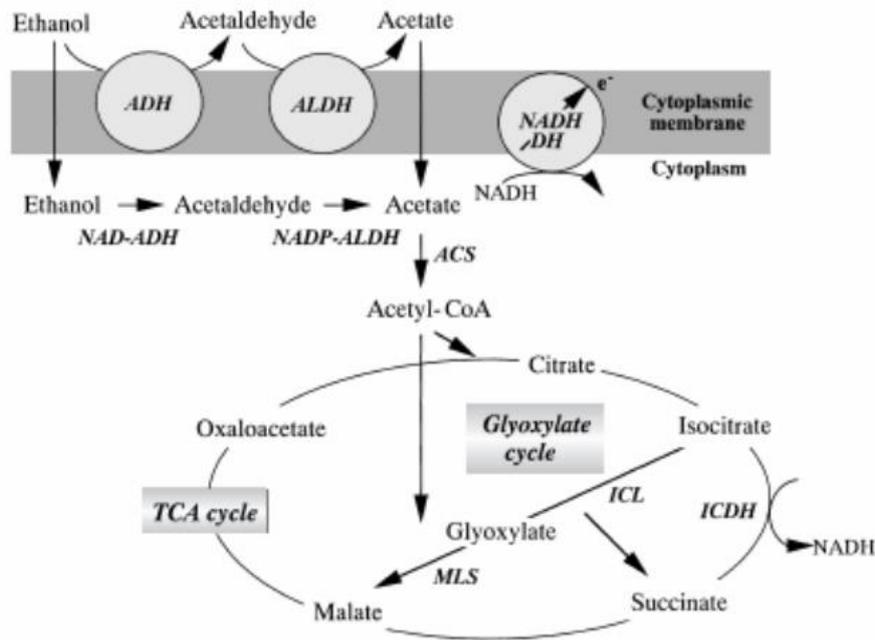


Figura 1.2 Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del glioxilato vía acetil-CoA (Chinnawirotpisan et al. 2003).

1.1.3.2 METABOLISMO DE OTROS ALCOHOLES

El glicerol, después del etanol, es el alcohol más utilizado como fuente de C por las BAA. El glicerol es transformado en dihidroxiacetona (cetogénesis), sin embargo, *A. pasteurianus* no puede producir este producto (Ribéreau Gayón et al. 2003). Éste proceso necesita una fuerte oxidación del medio y es inhibido cuando hay elevadas concentraciones de etanol, por lo tanto es poco probable que ocurra al inicio de un proceso de acetificación (Ribéreau Gayón et al. 2003).

La capacidad de oxidación se extiende también a otros alcoholes primarios y polialcoholes (propanol, butanol, manitol, sorbitol, etc.), los cuales son transformados a sus respectivas cetonas o cetosas. La localización en la membrana de la mayoría de las enzimas que catalizan estas reacciones produce

acumulación de estos sustratos en el medio (Deppenmeier et al. 2002), lo que es utilizado en la industria biotecnológica para la síntesis de compuestos: el sorbitol es transformado en sorbosa, el eritritol en eritruosa.

1.1.3.3 METABOLISMO DE LOS AZÚCARES

Las BAA pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de C, siendo la glucosa la más utilizada. La oxidación directa de los azúcares, sin fosforilación e incompleta conduce a las cetosas correspondientes. Las aldosas son oxidadas en ácidos aldónicos; así la glucosa es oxidada a ácido glucónico, reacción catalizada por la glucosa oxidasa (Ribéreau Gayón et al. 2003). Además, las BAA pueden utilizar otras fuentes de C: fructosa, galactosa, arabinosa, manosa, ribosa, xilosa (De Ley et al. 1984), así la galactosa es oxidada a ácido galactónico y la arabinosa a ácido arabinónico (González, 2005).

El género *Gluconobacter* se caracteriza por una fuerte actividad de oxidación de los azúcares en compuestos cetónicos, a diferencia del género *Acetobacter* cuyo metabolismo característico es la oxidación del etanol. Además, las bacterias del género *Gluconobacter* tienen la propiedad de oxidar el ácido glucónico y formar ácidos ceto-5-glucónico, ceto-2-glucónico y diceto-2,5-glucónico (Ribéreau Gayón et al. 2003). Estas últimas reacciones se utilizan para diferenciar especies.

Las cetosas no son fácilmente oxidadas por las BAA. La oxidación de la fructosa puede conducir a ácido glucónico y a ceto-5-fructosa y en algunos casos la cadena carbonada se escinde y se acumulan ácidos glicéricos, glicólico y succínico (Ribéreau Gayón et al. 2003).

La ruta por la cual las BAA oxidan la glucosa depende del pH y de la concentración de glucosa (Qazi et al. 1991). Los productos finales de todas las rutas descriptas pueden ser oxidados completamente hasta CO₂ y H₂O a través

del ciclo de Krebs, excepto en las especies del género *Gluconobacter*, que son incapaces de oxidar completamente estas moléculas por no tener funcional dicho ciclo (Ribéreau Gayón et al. 2003). En cambio los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y por tanto, ésta se dará sólo cuando se hayan consumido completamente las fuentes de C presentes en el medio (Saeki et al. 1997).

1.1.3.4 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Las BAA también pueden oxidar los ácidos orgánicos. Esta oxidación se realiza a través del ciclo de Krebs, obteniéndose como productos finales CO₂ y H₂O. Sin embargo, el género *Gluconobacter* no tiene las enzimas necesarias para realizar dicho ciclo, por lo tanto, es incapaz de metabolizar la mayoría de los ácidos orgánicos (Raspor y Goranovic 2008).

Las BAA pueden realizar una oxidación incompleta de los ácidos orgánicos generando metabolitos intermedios. Por ejemplo, los ácidos D y L láctico (fuente de C para algunas de ellas) puede ser oxidado totalmente a CO₂ y H₂O o parcialmente hasta ácido acético, por diferentes rutas metabólicas y con distintos productos finales. El primer intermediario es el piruvato, luego descarboxilado a acetaldehído y CO₂, por acción de la enzima piruvato descarboxilasa y posteriormente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Ribéreau Gayón et al. 2003).

1.1.3.5 METOBOLISMO DEL NITROGENO

Hay algunas especies, incluidas en los géneros *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* y *Swaminathania*, que son diazótrofes, es decir que poseen la

capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) y reducirlo a amonio (Pedraza 2008); sin embargo, la mayoría de las BAA utilizan el amonio inorgánico como única fuente de nitrógeno (N), y a partir de éste, pueden sintetizar todos los aminoácidos y compuestos nitrogenados orgánicos (De Ley et al. 1984). Las especies reconocidas hasta el momento son: *Ga. diazotrophicus*, *Ga. johannae*, *Ga. azotocaptans*, *S. salitolerans*, *A. peroxydans* y *A. nitrogenifigens* (Pedraza 2008; Loganathan y Nair 2004; Dutta y Gachhui 2006).

1.1.4 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA

Es universalmente conocida la habilidad de las BAA para oxidar azúcares y alcoholes, obteniéndose como producto final una acumulación de ácidos orgánicos; capacidad que es aprovechada en la industria de alimentos para la elaboración de vinagres de vinos y de frutas. Sin embargo, las BAA también intervienen en otros procesos biotecnológicos importantes y no tan conocidos. Algunos de estos pueden ser: producción de sorbosa a partir de sorbitol, obtención de D-ácido glucónico y ácidos 2-cetoglucónico y 5-cetoglucónico a partir de la D-glucosa, producción de ácido ascórbico (vitamina C) y de celulosa, síntesis de dihidroxiacetona a partir de glicerol (Gupta et al. 2001; González 2005; Komagata et al. 2014). Además, intervienen positivamente, en los procesos fermentativos para la obtención de chocolate a partir del cacao, de café, de nata de coco y cervezas especiales, o negativamente en la alteración de cervezas, vinos y sidras (Bartowsky et al. 2003; De Vuyst et al. 2008).

Recientes investigaciones demuestran que las BAA pueden ser utilizadas como probióticos y podrían tener efecto sobre células cancerosas (Haghshenas et al. 2015a; Haghshenas et al. 2015b). Particularmente *A. indonesiensis* aislada de yogur y *A. syzygii* aislada de cuajada exhiben propiedades típicas probióticas, como la tolerancia deseable a pH bajo y alta concentración de sales biliares, funciones inhibitoras contra patógenos y una aceptable susceptibilidad a los antibióticos. Las altas propiedades antimicrobianas de las cepas de

Acetobacter pueden estar relacionadas con la producción de ácido acético, que muestra mayor actividad antagónica que el ácido láctico (Haghshenas et al. 2015a). Además, el hallazgo de citotóxico de los metabolitos producidos por *A. syzygii* mostraron mayor actividad contra el cáncer que los producidos por *A. indonesiensis* en las células cancerosas examinadas (Haghshenas et al. 2015b).

1.1.4.1 PRODUCCIÓN DE CELULOSA

La celulosa es un polímero formado por la unión de moléculas de glucosa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico, que puede ser sintetizada por algunas especies de *Gluconacetobacter*, entre ellas la más conocida como productora de celulosa es *Ga. xylinus* (hoy reclasificada como *Komagataeibacter xylinus*, Yamada et al. 2012a, 2012b) (Cháves-Pacheco et al. 2004; Raspor y Goranovic 2008). La celulosa bacteriana (CB) formada no difiere significativamente de la celulosa vegetal. Sin embargo, no forma parte de la pared celular, sino que la CB se organiza como una matriz exterior a la pared, donde las bacterias se encuentran incrustadas en una maraña de microfibrillas de celulosa. Cuando éstas BAA crecen en un frasco sin agitación, forman una película superficial de celulosa, en la cual se desarrollan las bacterias. Dado que son aerobias estrictas, la capacidad de formar dicha película puede ser un medio para asegurarse la permanencia en la superficie del líquido, donde hay más oxígeno (Mandigan et al. 2009).

La CB tiene ventajas sobre la celulosa vegetal debido a que se caracteriza por ser químicamente pura, libre de lignina y hemicelulosa, como también por sus fibras ultra finas, alta fuerza mecánica, biodegradabilidad, capacidad para absorber agua y altamente cristalina (Chawla et al. 2009).

La CB despierta mucho interés debido a sus múltiples aplicaciones: alimenticias (fibra dietética, espesante, Té de manchú, nata de coco), farmacéuticas y cosméticas (estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas, creación de uñas artificiales), turísticas (ropa deportiva y equipos de

acampar), médicas (sustituto temporal de la piel, componente de implantes dentales), ambientales (derrames de aceite), acústicas (alta velocidad sónica), producción de papeles y sus derivados, entre otros (Cháves-Pacheco et al. 2004; Chawla et al. 2009).

La producción de CB por *Ga. xylinus* depende de la composición del medio de cultivo, pH y tensión de oxígeno. Se ha reportado el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, glicerol, melaza, lactato, citrato, etanol, licor de maíz, soya, extracto de levadura, peptona, hidrolizado de caseína, amonio, (Jaramillo et al. 2012). La producción de CB se ha realizado en cultivos estáticos y agitados en forma continua o discontinua en diferentes biorreactores con agitación constante y/u oxígeno (Jaramillo et al. 2012).

Si bien *Ko. xylinus* es considerado el microorganismo modelo en la producción de CB (Valera et al. 2014), nuevas investigaciones demuestran que otras especies de BAA también pueden formar CB, *Ko. hansenii* (anteriormente *Ga. hansenii*) (Aydin y Aksoy 2009, 2013), *Ko. sucrofermentas* (Tsouko et al. 2015), *Ko. medellinensis* (Castro et al. 2013), *A. pasteurianus* (Gullo et al. 2012) y *G. oxidans* (Jia et al. 2004).

1.1.4.2 PRODUCCIÓN DE SORBOSA Y DE VITAMINA C

La producción de ácido L-ascórbico (vitamina C) es un proceso biotecnológico catalizado por *G. oxidans*. La vitamina C tiene importancia en la nutrición humana y animal y puede ser utilizada como antioxidante en la industria de los alimentos (Komagata et al. 2014). El ácido L-ascórbico puede formarse a partir de L-sorbosa, pero la sorbosa es difícil de sintetizar químicamente. Sin embargo, puede obtenerse fácilmente por métodos microbiológicos a partir de las BAA, que oxidan incompletamente el D-sorbitol (un alcohol de azúcar fácilmente disponible) a L-sorbosa, en un proceso que se llama bioconversión y que involucra la enzima sorbitol deshidrogenasa presente

en *G. oxidans* (Mandigan et al. 2009; Komagata et al.2014). Posteriormente, la L-sorbosa es cristalizada y condensada con acetona formándose sorbosa diacetona. Esta última es oxidada nuevamente, a 2-ceto ácido L-glucónico usando platino como catalizador. El ácido ascórbico se forma por reacciones de enolización y lactonización, con un rendimiento del 50% (Deppenmeier et al. 2002). El uso de bacterias del ácido acético hace la producción de ácido ascórbico económicamente posible (Mandigan et al. 2009).

1.1.4.3 PRODUCCIÓN DE VINAGRES

Como fue expresado en el apartado 1.1.4, la biooxidación incompleta del etanol presente en un mosto alcohólico, a ácido acético es la cualidad más conocida de las BAA. Como uno de los objetivos de estudio de esta Tesis es el aislamiento de estas bacterias para ser usadas como cultivo iniciador en la elaboración de vinagre de frutas, se ha puesto mayor énfasis en el estudio del proceso de acetificación.

1.2 VINAGRE

El vinagre ha sido considerado como uno de los productos de calidad más baja de los alimentos fermentados, ya que antiguamente fue calificado como un accidente en el proceso de vinificación. Sin embargo, en la actualidad, se ha convertido en uno de los aderezos más versátil y utilizado, sobre todo en la cocina gourmet. En ese sentido, las industrias han captado las preferencias de los consumidores y han comenzado a elaborar vinagres más selectos. Es por eso que en Argentina, se pueden encontrar vinagres varietales a base de Malbec, Merlot, Cabernet sauvignon, Torrontés tardío. Una innovación es un vinagre de higos (con una acidez del 4%) producido en Tucumán. Pero es en

los saborizados donde el mercado es cada vez más rico en propuestas: saborizados con pimienta de cayena, romero, estragón u orégano, Vinagre Balsámico con sabor a nuez pecán y Aceto Andino de frutos del bosque, que en rigor es un vinagre al que maceraron con moras, arándanos, frambuesas y frutillas.

Desde la antigüedad, el vinagre ha formado parte de la alimentación humana, ha sido ampliamente utilizado como condimento de alimentos, como un agente conservante, como base para remedios sencillos para hombres y animales y en algunos países, como bebida saludable (Solieri y Giudicci 2009).

El vinagre es el producto obtenido por la doble fermentación (alcohólica y acética) de cualquier solución de azúcares y/o sustancias amiláceas fermentables, (Casale et al. 2006; Tesfaye et al. 2009). En la primera fermentación las levaduras, del género *Saccharomyces*, convierten el azúcar en etanol anaeróbicamente, mientras que en la segunda fermentación el etanol es oxidado a ácido acético aeróbicamente por BAA. Los sustratos normalmente utilizados para la acetificación pueden ser vino, sidra, cerveza u otro sustrato alcohólico derivado de la fermentación de granos, frutas, miel, melazas (Raspor y Goranovic 2008).

1.2.1 MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE VINAGRES

Desde el punto de vista tecnológico, existen distintos métodos para la elaboración de vinagres. Uno de ellos, el más antiguo, es el sistema de cultivo en superficie, también llamado método tradicional o método Orleans. El método Schützenbach fue el primer paso para transformar el método artesanal (Orleans) en el primer proceso industrial. Actualmente, el más utilizado es el sistema de cultivo sumergido (Tsfaye et al. 2002).

1.2.1.1 MÉTODO EN SUPERFICIE

En este método, las BAA se encuentran en la superficie del mosto alcohólico a acetificar, formando una película de celulosa llamada "madre del vinagre". La presencia de las BAA en la interfase líquido /aire se debe a que éstas son aerobias estrictas, y por lo tanto es la única manera que tienen de obtener oxígeno para crecer y oxidar el etanol a ácido acético.

Para elaborar vinagre, el mosto alcohólico se carga en toneles de madera, convenientemente perforados para su aireación. Una vez alcanzado el grado de acidez deseado, se extrae una parte del contenido del tonel, se lo sustituye por nuevo líquido alcohólico, y así recomienza el proceso (Adams y Moss 1997). El limitado oxígeno que tienen disponible las BAA hacen que este proceso sea lento, es decir se necesita un tiempo largo para obtener una acidez adecuada. Sin embargo, estos vinagres presentan mayor calidad organoléptica y un bouquet característico, debido principalmente a la utilización de toneles de madera que permiten que se realice la acetificación y el envejecimiento al mismo tiempo (Tesfaye et al. 2002).

Actualmente, es empleado para la producción de vinagres selectos y con un alto valor agregado; ya que los largos tiempos requeridos para su elaboración, así como los altos costos de inversión e instalación incrementan en gran medida, los costos de producción (Tesfaye et al. 2009). Como ejemplo se puede citar la elaboración del vinagre artesanal con denominación de origen y reconocimiento internacional: Aceto Balsámico de la ciudad italiana de Módena .

1.2.1.2 MÉTODO SCHÜTZENBACH

Se logra aumentar la velocidad de acetificación incrementando la superficie de contacto de las BAA con el oxígeno. El mosto alcohólico a acetificar, se hace pasar a través de un lecho empacado con virutas de madera, donde están adheridas las células bacterianas. El aire se introduce a

contracorriente por orificios en el fondo del equipo fluyendo por convección natural (Adams y Moss 1997).

1.2.1.3 CULTIVO SUMERGIDO

En este sistema las BAA se encuentran sumergidas en la solución a acetificar y se pueden obtener vinagres con un elevado grado acético en períodos muy cortos de tiempo (24 horas). Se hace circular aire en forma de burbujas a través de la biomasa bacteriana, inyectando aire solo o mezclado con oxígeno, lo que favorece la acetificación. La mayor cantidad de biomasa, como la disponibilidad constante de oxígeno, permite obtener rendimientos de transformación de etanol en ácido acético muy elevados y uniformidad en el producto. Sin embargo, se requiere un control estricto de la temperatura y de la presión parcial de oxígeno. Una disminución en este último, disminuye la actividad de la población celular. Además la fuerte aireación y agitación influye negativamente en la composición volátil del vinagre, por lo tanto en su calidad final (Ormaechea Landa 1991).

Una de las características más importantes de los biorreactores utilizados en estos procesos es el sistema de aireación. Este consta de una turbina que aspira el aire desde el exterior y lo libera en los orificios radiales, en forma de finas burbujas. La mezcla de aire-líquido es empujada hacia arriba y desviada por los deflectores. Toda la masa se mantiene en un estado constante de agitación para evitar la formación de zonas de baja tensión de oxígeno, que son desfavorables para el metabólica actividad de BAA (Gullo et al. 2014).

1.2.2 LAS BAA EN LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES

A pesar de los intentos de estandarizar el proceso de acetificación para la elaboración de vinagres, todavía, no hay disponible en el mercado un cultivo

iniciador de bacterias del ácido acético. La falta de arrancadores puede causar varios problemas en la producción de vinagre y, consecuentemente, pérdidas económicas. Contar con un cultivo starter fiable podría acelerar el comienzo de la oxidación, así como también, disminuir los problemas de contaminación y los tiempos de proceso (Ndoye et al. 2009).

También se han llevado a cabo importantes estudios para examinar la microflora prevalente, con el fin de determinar el papel de BAA en la fermentación de vinagre (Gullo et al. 2006; Gullo et al. 2009; Fernández-Pérez et al. 2010; Wu et al. 2010; Wu et al. 2012; SlapsaK et al. 2013). Estos estudios demuestran que la acidez del vinagre influye en el tipo de bacterias encontradas. En vinagres con alta acidez (ácido acético > 6% (w/v)) se favorece la prevalencia de especies *Gluconacetobacter*, cuya ADH muestra una mayor estabilidad en alto contenido en ácido acético (Boesch et al. 1998; Schuller et al. 2000); en vinagres de baja acidez (concentración de ácido acético <6% (w/v)) son dominantes las especies de *Acetobacter*, aunque también se ha encontrado *Gluconacetobacter*.

1.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES

Los factores que pueden influir en la fermentación acética están relacionados con el metabolismo: sustrato (concentración de etanol y de ácido acético), oxígeno y temperatura.

1.2.3.1 TEMPERATURA

En el proceso de elaboración de vinagres, la temperatura es un parámetro importante a controlar. El rango de temperatura óptima para el crecimiento de las BAA es 25-30°C (Saeki et al. 1997; Ndoye et al. 2006). Habitualmente, la producción industrial de vinagre se realiza a 30°C y con un estricto control de esta variable. Incrementos de 2 a 3 °C pueden causar serios

inconvenientes tanto en la velocidad del proceso como en el rendimiento. Este último resulta afectado debido a la evaporación de compuestos volátiles entre los que se incluyen el sustrato (etanol), el producto intermedio (acetaldehído) y el producto final (ácido acético) (Romero y Cantero 1998). Sin embargo, se han realizado estudios donde se demuestra que las BAA pueden crecer y producir ácido acético con un buen rendimiento a temperaturas superiores, incluso a 38 – 40 °C (Ndoye et al. 2006).

1.2.3.2 CONCENTRACION DE ETANOL.

El etanol presente en el mosto destinado a la elaboración de vinagres puede causar efectos adversos. Altas concentraciones de etanol pueden provocar inhibición en el crecimiento de las BAA y valores superiores a 50 g/L influyen negativamente en la velocidad de acetificación. Por otro lado valores muy bajos en la concentración de etanol puede tener un efecto sobre la viabilidad celular, dependiendo de la acidez del medio. Esto es muy importante, cuando se va utilizar el vinagre obtenido como cultivo iniciador en posteriores procesos. Si el etanol baja a valores inferiores a 0,2% en volumen, se corre el riesgo que el ácido acético formado se oxide completamente a CO₂ y H₂O y consecuentemente habrá pérdidas en el rendimiento (García-García et al. 2009).

1.2.3.3 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

La concentración de ácido acético es un importante factor de estrés fisiológico de las células. El ácido acético no disociado puede penetrar la membrana celular, lo que altera los procesos de transporte de dicha membrana y, a continuación, se disocia en el interior de la célula, dando lugar a niveles tóxicos del anión y consecuentemente, un aumento en la acidez (Adams 1998).

Aunque las BAA son tolerantes a ácido acético a concentraciones que son perjudiciales para la mayoría de los microorganismos, existe una variación significativa entre las especies BAA. Por otra parte, durante las diferentes fases de fermentación de SF, las cepas exhiben diferentes grados de resistencia al ácido acético. Esta resistencia se ve afectada por la densidad de población de BAA, las condiciones de cultivo y el tiempo transcurrido entre el aislamiento de la cepa y su aplicación industrial (Sokollek et al. 1998a; Gullo et al. 2012)

El efecto del ácido acético sobre el crecimiento BAA depende de las concentraciones de sustrato (etanol) y del producto (ácido acético) y de las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, para cepas de *Acetobacter*, en cultivos agitados de etanol, se encontró que 10 g/L de ácido acético tiene un efecto activador sobre el crecimiento, y concentraciones más bajas una disminución significativa en la fase de crecimiento logarítmica (Nanba et al. 1984). Las cepas de *Ga. europaeus* aisladas de los biorreactores de vinagre industriales toleran concentraciones de ácido acético hasta 100 g/L (Trček et al. 2007), esta adaptación a estas condiciones extremas podría ser la consecuencia de mutaciones y reordenamientos del genoma (Andrés-Barrao et al. 2011). *A. aceti* en cultivo continuo con etanol como sustrato crece a concentraciones de acetato superiores a 70 g/L (Park et al. 1989).

1.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. R. (1998). Vinegar. In B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*. pp. 1–44. Springer US.
- Adams, M. R. y Moss, M. O. (1997). *Microbiología de los Alimentos*. Acribia, Zaragoza, España.

Andrés-Barrao, C., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Descombes, P., Pérez, R. O. y Barja, L. C. C. (2011). Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890T and *G. europaeus* lmg 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). *Journal of Bacteriology*, *193*(10), 2670–2671.

Asai, T. (1935). Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, *11*, 674–708.

Asai, T., Iizuka, H. y Komagata, K. (1964). The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediae strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *10*(2), 95–126.

Aydin, Y. A. y Aksoy, N. D. (2009). Isolation of Cellulose Producing Bacteria from Wastes of Vinegar Fermentation. *Proceeding of the World Congress on Engineering and Computer Science*, *I*, 20–23.

Aydin, Y. A. y Aksoy, N. D. (2013). Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(3), 1065-1075.

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

Beijerinck, M. W. (1898). Ueber die Arten der Essigbakterien. *Centralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde Und Infektionskrankheiten*, *2*(4), 209–216.

Beijerinck, M. W. y Folpmers, T. (1916). Verslagen van de gewone vergadering der wis- en natuurkundige afdeling. *Koninklijke Akademie van Wetenschappen Te Amsterdam*, *18*, 1198–1200.

- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M. y Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(2), 220–9.
- Buchanan, R. (1970). Review of Asai's 1934-35 contributions to the taxonomy of the acetic acid bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20, 115–117.
- Carr, J. G. y Shimwell, J. L. (1961). The Acetic Acid Bacteria, 1941-1961. A critical Review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 27(1), 386-400.
- Casale, M., Sáiz Abajo, M. J., González Sáiz, J. M., Pizarro, C. y Forina, M. (2006). Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 360–366.
- Castro, C., Cleenwerck, I., Trcek, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Aguirre R., Putaux, J. y Gañán, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 1119–25.
- Cháves-Pacheco, J. L., Martínez Yee, S., Contreras, M. y Marván Escamilla, E. (2004). Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7, 18–25.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A. y Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O. O. y Matsushita, K. (2003). Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase

in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 564–571.

Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1647–52.

Cleenwerck, I. y De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2–14.

Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. (2008). *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2180–5.

Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. y Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1551–1558.

De Ley, J., Gillis, M. y Swings, J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae*. In N. R. Krieg y J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. pp. 267–278. Williams y Wilkins, Baltimore.

De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P. y Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 79–90.

- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. y Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 233–42.
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal Enology and Viticulture*, 39, 143–154.
- Du Toit, W. J. y Pretorius, I. S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52, 155–179.
- Dutta, D. y Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1899–903.
- Euzéby, J. P. (1987). LPSN bacterio.net. [sitio web] [Consulta: 28 julio 2015]. Disponible en: <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S. y Ruiz-Larrea, F. (2010). Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology*, 27(8), 973–8.
- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E. y Sly, L. I. (1999). Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), 1681–1693.
- Fu, L., Zhang, F. y Zhang, B. (2013). Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 50(24), 114–119.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., Wang, E., Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellano, J.

- (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1305–1314.
- García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E. y Bonilla-Venceslada, J. L. (2009). Vinegars Engineering. In L. Solieri y P. Giudici (Eds.), *Vinegars of the World*. pp. 97–120. Milán, Italia, Springer-Verlag Italia.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M. y Stephan, M. P. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 361–364.
- González, Á. (2005). *Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Gossele, F., Swings, J., Kersters, K. y Ley, J. D. E. (1983). Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electropherograms of *Gluconobacter* Asai 1935 emend. mut. char. Asai, Iizuka, and Komagata 1964. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(1), 65–81.
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Holland, S. y Zelazny, A. M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(11), 2609–16.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–12.

- Gullo, M., De Vero, L. y Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2585–9.
- Gullo, M. y Giudici, P. (2009). Acetic acid bacteria taxonomy from early descriptions to molecular techniques. In Solieri L. y Giudicci P (Ed.), *Vinegars of the World*. pp. 41–60. Milán, Italia, Springer-Verlag Italia.
- Gullo, M., Mamlouk, D., De Vero, L. y Giudici, P. (2012). *Acetobacter pasteurianus* strain AB0220: cultivability and phenotypic stability over 9 years of preservation. *Current Microbiology*, 64(6), 576–80.
- Gullo, M., Verzelloni, E. y Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 49(10), 1571–1579.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N. y Kumar, A. (2001). *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(3), 445–456.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. y Khosroushahi, A. (2015a). Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International Journal of Food Science y Technology*, 50(4), 1056–1064.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R. y Khosroushahi, A. (2015b). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *Food Science and Technology*, 60(2), 690–697.
- Iino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. y Uchimura, T. (2012a). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from

- stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 235–243.
- Iino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. y Uchimura, T. (2012b). *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1465–1469.
- Jara, C. I. (2009). *Desarrollo de métodos de Biología Molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Jaramillo, R., Tobio, W. y Escamilla, J. (2012). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. Effect of sucrose in the production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* in static culture. *Revista MVZ Córdoba*, 17(2), 3004–3013.
- Jia, S., Ou, H., Chen, G., Choi, D., Cho, K., Okabe, M. y Cha, W. S. (2004). Cellulose production from *Gluconobacter oxydans* TQ-B2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 166–170.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S. y Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2263–7.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau Gayón, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 153–156.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 559–563.

- Katsura, K., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2002). *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1635–1640.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. y Swings, J. (2006). The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes*, 5, 163–200.
- Komagata, K., Iino, T. y Yamada, Y. (2014). The Family *Acetobacteraceae*. In E. R. et al. (Ed.), *The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (545–577). Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2010). *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 81–87.
- Li, L., Praet, J., Borremans, W., Nunes, O. C., Manaia, C. M., Cleenwerck, I., meeus, I., Smagghe, G., De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2015). *Bombella intestini* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from bumble bee crop. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 267–273.
- Li, L., Wieme, A., Spitaels, F., Balzarini, T., Nunes, O. C. y Célia, M. (2014). *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir and identification of *Acetobacter* species by dnaK, groEL and rpoB sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7), 2407–2415.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2003). Diversity of Acetic Acid Bacteria in

Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 91–99.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(3) 147-165.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(3), 119–131.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y. y Uchimura, T. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Food Science y Technology*, 52, 813–818.

Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T. y Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2101–11.

Loganathan, P. y Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1185–90.

Lu, S., Lee, F. y Chen, H. (1999). A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 55–62.

Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Vu, H., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Tanasupawat, S., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2013). *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 375–384.

Malimas, T., Yukphan, P., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2009). *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55, 247–254.

Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2007). *Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 301–307.

Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2008a). *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 666–71.

Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. y Tanticharoen, M. (2008b). *Gluconobacter roseus* (ex Asai 1935) sp. nov., nom. rev., a pink-colored acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54, 119–125.

- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2008c). Full Paper *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *54*, 211–220.
- Mandigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). *Brock, Biología de Los Microorganismos*. P. Hall, Ed. 12^o Edición. Madrid, España.
- Mas, A., Torija, M. J., García-Parrilla, M. C. y Troncoso, A. M. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, (ID 394671), 1–7.
- Matsushita, K., Toyama, H. y Adachi, O. (1994). Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, *36*, 247–301.
- Nanba, A., Tamura, A. y Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, *62*(6), 501–505.
- Navarro, R. R. y Komagata, K. (1999). Differentiation of *Gluconacetobacter liquefaciens* and *Gluconacetobacter xylinus* on the basis of DNA base composition, DNA relatedness, and oxidation products from glucose. *Journal of Applied Bacteriology*, *45*, 7-15.
- Navarro, R., Uchimura, T. y Komagata, K. (1999). Taxonomic heterogeneity of strains comprising *Gluconacetobacter hansenii*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *45*(6), 295–300.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Destain, J., Guiro, A. y Thonart, P. (2009). Preservation of Vinegar Acetic Acid Bacteria. In L. Solieri y P. Giudicci

(Eds.), *Vinegars of the World* pp. 61–71. Milán, Italia: Springer- Verlag Italia, Italia.

Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A., Kere, C., Diawara, B. y Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 916–923.

Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J., Kigawa, R., Sano, C. y Sugiyama, J. (2013). *Gluconacetobacter tumulisoli* sp. nov., *Gluconacetobacter takamatsuzukensis* sp. nov. and *Gluconacetobacter aggeris* sp. nov., isolated from Takamatsuzuka Tumulus samples before and during the dismantling work in 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(11), 3981–8.

Ormaechea Landa, A. R. (1991). Proceso industrial de elaboración de vinagre. In C. Llaguno Marchena y M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* pp. 49–68. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Park, Y. S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. y Toda, K. (1989). Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentrations on Acetic Acid Production in Continuous Culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(2), 96–101.

Pedraza, R. O. (2008). Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 25–35.

Polo Sanchez, M. C., y Sanchez- Luengo, A. A. (1991). Las bacterias acéticas. In E. C. (Consejo S. de I. Científicas) (Ed.), *El vinagre de vino* pp. 25–45. Madrid, España: Editorial CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

- Qazi, G. N., Parshad, R., Verma, V. y Chopra, C. L. (1991). Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 504–507.
- Ramírez-Bahena, M. H., Tejedor, C., Martín, I., Velázquez, E. y Peix, A. (2013). *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(5), 1760–1765.
- Raspor, P. y Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–24.
- Ribéreau Gayón, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. y Lonvaud, A. (2003). *Tratado de Enología. Microbiología del vino*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Roh, S. W., Nam, Y. D., Chang, H. W., Kim, K. H., Kim, M. S., Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee W. J. y Bae, J.-W. (2008). Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6171–6177.
- Romero, L. E. y Cantero, D. (1998). Evaluation of ethanol evaporation losses in acetic acid fermentations. *Bioprocess Engineering*, 18(4), 289–291.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. y Adachi, O. (1997). Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 138–145.
- Schuller, G., Hertel, C. y Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2013–2020.

- Shimwell, J. L. (1958). A Re-assessment of the genus *Acetobacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 25, 49-67.
- Sievers, M., Stöckli, M. y Teuber, M. (1997). Purification and properties of citrate synthase from *Acetobacter europaeus*. *FEMS Microbiology Letters*, 146, 53–58.
- Sievers, M. y Swings, J. (2005). Family *Acetobacteraceae*. In G. M. Garrity (Ed.), *Bergey's Manual of Bacteriology*. New York: Springer-Verlag.
- Silva, L. R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M. E., Willems, A. y Velázquez, E. (2006). *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 21–4.
- SlapsaK, N., Cleenwerck, I., De Vos, P. y Trček, J. (2013). *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 17–21.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998a). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 3195–206.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998b). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 935–940.
- Solieri, L. y Giudicci, P. (2009). *Vinegars of the World*. (L. Solieri y P. Giudicci, Eds.) *Vinegars of the World*. Milán, Italia: Springer-Verlag Italia.
- Spitaels, F., Li, L., Wieme, A., Balzarini, T., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2014). *Acetobacter lambici* sp. nov., isolated from fermenting lambic beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1083–1089.

Suzuki, R., Zhang, Y., Iino, T., Kosako, Y., Komagata, K. y Uchimura, T. (2010). *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 339–346.

Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2011b). *Gluconobacter uchimurae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(5), 293–301.

Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2011a). *Acetobacter farinalis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57, 159–167.

Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O. y Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 159–167.

Tazato, N., Nishijima, M., Handa, Y., Kigawa, R., Sano, C. y Sugiyama, J. (2012). *Gluconacetobacter tumulicola* sp. nov. and *Gluconacetobacter asukensis* sp. no., isolated from the stone chamber interior of the Kitora Tumulus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2032–2038.

Tesfaye, W., Morales, M. L., Garcá, M. C. y Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science y Technology*, 13, 12–21.

Tesfaye, W., Morales, M. L., Garcia-Parrilla, M. C. y Troncoso, a. M. (2009). Improvement of wine vinegar elaboration and quality analysis: instrumental

- and human sensory evaluation. *Food Reviews International*, 25(2), 142–156.
- Tindall, B. J., Kämpfer, P., Euzéby, J. P. y Oren, A. (2006). Taxonomic note valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2715–2720.
- Trček, J. y Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 137–144.
- Trček, J., Jernejc, K. y Matsushita, K. (2007). The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles*, 11, 627–635.
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F. y Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14832–14849.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K.-I. y Komagata, K. (1989). *Acidomonas* gen. nov., Incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 50–55.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A. y Mateo, E. (2014). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1349–1361.
- Vu, H. T. L., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Muramatsu, Y., Thi Tu Bui, U., Tanasupawat, S., Duong, K., Nakagawa, Y., Thanh Pham,

- H. y Yamada, Y. (2013). *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov. sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 153–166.
- Vu, H. T. L., Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Bui, V. T. T., Yukphan, P., Bui, U. T. T., Muramatsu, Y., Sitdhipol, J., Tanasupawat, S., Duong, K. C., Nakagawa, Y., Pham, H. T. y Yamada, Y. (2015). *Tanticharoenia aida* sp. nov., for acetic acid bacteria isolated in Vietnam. *Annals of Microbiology*, DOI 10.1007/s13213-015-1124-z.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F. y Giudici, P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current Microbiology*, 60(4), 280–286.
- Wu, J. J., Kun Ma, D. Y., Zhang, F. F. y Chen, F. S. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of Shanxi aged vinegar, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, 30(1), 289–297.
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* com. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2225–2227.
- Yamada, Y. (2014). Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1670–1672.
- Yamada, Y., Hoshino, K. y Ishikawa, T. (1997a). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA. *Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ*, 47, 37-44.

- Yamada, Y., Hoshino, K. y Ishikawa, T. (1997b). The phylogeny of acetic bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 61(8), 1244-1251
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. y Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 23–28.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T. y Uchimura, T. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 823–829.
- Yamada, Y. y Kondo, K. (1984). *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30, 297–303.
- Yamada, Y. y Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15-24.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. y Nakagawa, Y. (2012a). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849–859.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. Tanasupawat, S. y Nakagawa, Y. (2012b). Description of *Komagataeibacter*

gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 397–404.

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

Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K. y Yamada, Y. (2010). *Gluconobacter wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from Thai isolates in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 67–73.

Yukphan, P., Malimas, T. M., Muramatsu, Y. M., Takahashi, M. T., Kaneyasu, M. K., Tanasupawat, S. T., Nakagawa, Y. N., Potacharoen, W. P. y Yamada, Y. (2008). *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a New Osmotolerant Acetic Acid Bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 672–676.

Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2005). *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 301–311.

Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2004a). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 313–316.

Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2004b). *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the

α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 235–242.

Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2011). *Neokomagataea* gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., Osmotolerant Acetic Acid Bacteria of the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(3), 419–426.

Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Hamana, K., Tahara, Y., Suzuki, K. y Yamada, Y. (2009). *Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an Acetic Acid Bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(10), 2156–2162.

CAPÍTULO N° 2

OBJETIVOS. PLAN DE TRABAJO

2.1 JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Alimentación, dependiente de la Universidad Nacional de Entre Ríos (Argentina). La Tesis plantea el aislamiento de bacterias del ácido acético a partir de frutas de la región con el fin de utilizarlas para la elaboración de productos innovadores, como lo son los vinagres de frutas, una posible alternativa de industrialización para los excedentes de las mismas.

A pesar de los intentos de estandarizar el proceso de acetificación para la elaboración de vinagres, todavía, no hay disponible en el mercado un cultivo iniciador (starter) de bacterias del ácido acético. La falta de arrancadores puede causar varios problemas en la producción de vinagre y, consecuentemente, pérdidas económicas. Contar con un cultivo starter fiable podría acelerar el comienzo de la oxidación, así como disminuir los problemas de contaminación y los tiempos de proceso. Para emplear microorganismos en procesos industriales es necesario contar con información taxonómica precisa, por lo que se hace necesario emplear métodos alternativos de identificación genotípica para completar los métodos fenotípicos.

En la región donde se desarrolla el presente proyecto, tiene mucha importancia desde hace mucho tiempo, el cultivo de frutas cítricas, principalmente naranjas y mandarinas, y más recientemente se ha incorporado el cultivo de arándanos. La producción de fruta fresca, deja un remanente de descarte, debido principalmente a su tamaño, el cual podría ser destinado a la fabricación de productos regionales como es el caso de vinos y vinagres. Para ello es necesario contar con un cultivo iniciador caracterizado.

Por todo lo expuesto, el estudio de la diversidad de bacterias del ácido acético, que forma parte de la microflora primaria de arándanos y frutas cítricas, aportaría nuevos conocimientos de la microbiota de dichas frutas, y por otro lado puede contribuir al desarrollo de procesos biotecnológicos destinados

a obtener nuevos productos en el mercado, como podrían ser vinagres de arándanos, vinagres de naranjas y vinagres de mandarinas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Aislar, identificar y caracterizar bacterias del ácido acético a partir de la flora epifítica de arándanos y frutas cítricas cultivadas en la región de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina), con el fin de encontrar la más adecuadas para ser utilizadas en procesos industriales.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr los Objetivos Generales, se plantean los siguientes Objetivos específicos.

- Aplicar técnicas de enriquecimiento y de aislamiento para aislar bacterias del ácido acético a partir de arándanos y frutas cítricas.
- Determinar características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas.
- Aplicar metodología de Biología Molecular para identificar las bacterias aisladas utilizando PCR-RFLP del 16S ADNr y PCR-RFLP 16S-23S ADNr.
- Estudiar el comportamiento tecnológico de las bacterias aisladas a fin de elegir las más adecuadas para desarrollar un cultivo iniciador de bacterias del ácido acético apto, para la producción de vinagres de frutas.

- Estudiar la metodología más apropiada de conservación de los cultivos que permitan el mantenimiento de su pureza y actividad a lo largo del tiempo.

2.3 PLAN DE TRABAJO

Para lograr los objetivos planteados se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- 1) Revisión bibliográfica permanente.
- 2) Toma de muestras de arándanos y frutas cítricas en su óptimo estado de madurez en los respectivos meses de cosecha. Estas muestras fueron el material de partida para realizar los aislamientos de BAA.
- 3) Estudio de las características morfológicas y las propiedades bioquímicas y/o fisiológicas de las bacterias aisladas, de acuerdo a la metodología propuesta.
- 4) Con los resultados hallados en los ensayos de caracterización se procedió a la identificación de las bacterias del ácido acético por comparación de las características fenotípicas.
- 5) Para realizar los estudios genotípicos se buscaron las mejores condiciones para la extracción del ADN de las bacterias para el posterior amplificado por PCR.
- 6) Se optimizaron las condiciones de PCR en cuanto a concentraciones de reactivos, tiempos y temperaturas de amplificación, para lograr un amplificado de buena calidad.
- 7) Se optimizaron las condiciones para la digestión del producto amplificado por PCR con enzimas de restricción, de esta manera se encontró el tiempo adecuado para realizar el corte enzimático.

- 8) Se obtuvieron los patrones de bandas característicos de cada aislado mediante electroforesis en agarosa.
- 9) Para la identificación de BAA, los perfiles RFLP se compararon con los patrones de bandas de las cepas patrones y las encontradas en la bibliografía específica.
- 10) Se realizó un análisis filogenético mediante un dendograma formado a partir del análisis RFLP del gen ribosomal 16S.
- 11) Se realizó secuenciación parcial del gen ribosomal 16S para confirmar los resultados obtenidos por PCR-RFLP. Con las secuencias se construyó un árbol filogenético.
- 12) Se realizaron ensayos tendientes a obtener las mejores condiciones para el desarrollo de cultivos iniciadores, para lo cual se probaron tres concentraciones de etanol (4, 6 y 8% v/v) y dos concentraciones de ácido acético (0,5 y 1,0% p/v).
- 13) Se estudiaron dos métodos de conservación de cultivo iniciador: liofilización y congelación. Para el primero, se utilizó como lioprotector leche en polvo y manitol y para la congelación se usó glicerol y manitol como crioprotector.

CAPÍTULO N° 3

***AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL
ÁCIDO ACÉTICO***

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO

Las BAA forman parte de la microflora epifítica primaria de las frutas, verduras y flores, por lo tanto es habitual aislarlas a partir de estos sustratos. Se han realizado numerosas investigaciones, donde el objetivo principal fue el aislamiento e identificación de BAA. Así por ejemplo, grupos de investigadores de los países del sudeste asiático (Indonesia, Tailandia y Filipinas), las aislaron de: flores, frutas, nata de coco, azúcar marrón, alimentos fermentados, pasta de soja, etc. provenientes de dichos países (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2001, 2002, 2003; Seearunruangchai et al. 2004; Komagata et al. 2014;). Además, se las puede encontrar en alimentos y bebidas fermentadas tales como cacao (Kersters et al. 2006; Cleenwerck et al. 2007; Garcia-Armisen et al. 2010; Romero-Cortes et al. 2012), café (Fuentes-Ramírez et al. 2001; Sengun y Karabiyikli 2011), vino y mosto de uvas (Du Toit y Pretorius 2002; Gonzalez et al. 2004, 2005; Valera et al. 2011), cerveza (Mason y Claus 1989; Cleenwerck et al. 2002; Lisdiyanti et al. 2000), te kombucha (Boesch et al. 1998; Yamada 2000; Dutta y Gachhui 2006), vinagre (Sokollek et al. 1998b; Yamada et al. 1997, 2000; Schuller et al. 2000; Lisdiyanti et al. 2006;), sidra (Kersters et al. 2006), bebidas regionales de Japón, China y otros países asiáticos; como el sake (Kersters et al. 2006) y el vinagre de arroz (Nanda et al. 2001; Moonmangmee et al. 2003; Kersters et al. 2006; Wu et al. 2010, 2012; Chen et al. 2013), vino de Palma (bebida popular de África y de América del Sur) (Kersters et al. 2006). Otros investigadores las han aislado a partir de miel (Kappeng y Pathom-aree 2009) y azúcar de caña (Gillis et al. 1989; Yamada et al. 1997). Por otro lado, pueden estar presentes en el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza de azúcar de caña, lo que provoca pérdidas de calidad del producto obtenido (Hurtado et al. 2011). Todos estos hallazgos sugieren que las BAA pueden habitar en diversos materiales y en distintas regiones del mundo.

La dificultad de crecimiento en los medios de cultivos habituales ha sido uno de los principales problemas para estudiar las BAA provenientes de procesos fermentativos (vinos, vinagres). Esta dificultad ha sido relacionada con el estrés causado en las BAA, cuando éstas pasan de un medio rico en etanol/ácido acético a un medio de cultivo de laboratorio que carece de estos componentes o los contiene en menor concentración (Entani et al. 1985; Sievers et al. 1992).

Las diferencias fisiológicas existentes entre géneros han llevado a crear medios de cultivos con diferentes fuentes de C (glucosa, manitol, etanol, ácido acético, etc.) para aislar BAA dependiendo de su origen: mosto de uva, vino, vinagre, plantas, flores, frutas, alimentos fermentados, etc.

Se han utilizado distintos caldos de enriquecimiento como alternativa para el aislamiento de mayor biodiversidad de BAA, en función de los requerimientos que tienen éstas por algunos nutrientes. Lisdiyanti et al. (2003) aislaron BAA procedentes de flores, frutos y alimentos fermentados, utilizando 5 medios de enriquecimientos diferentes. En este estudio pudieron observar diferencias en cuanto a las preferencias de las BAA por algunos nutrientes. En efecto, los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* fueron aislados principalmente en los caldos con etanol y ácido acético, en cambio el género *Gluconobacter* se recuperó del medio con sorbitol (Lisdiyanti et al. 2003).

Los medios con glucosa GYC (10% glucosa, 0,5% extracto de levadura, 0,3% de peptona, 0,12% de CaCO₃ y 2% agar), descrito por Carr y Passmore (1975) y manitol YPM (2,5% manitol, 0,5% extracto de levadura, 0,3% peptona, 2% agar) han sido los más utilizados para el aislamiento de BAA procedentes de mostos, vinos (Du Toit y Pretorius 2002; Drysdale y Fleet 1988; Du Toit y Lambrechts 2002; Bartowsky et al. 2003; Gonzalez et al. 2004; Mamlouk y Gullo 2013) y vinagres (Sokollek et al. 1998a, 1998b; Schuller et al. 2000; De Vero et al. 2006; Gullo et al. 2006, 2009; Ilabaca et al. 2008). Sin embargo, se han desarrollado otros medios de cultivos para BAA, por ej. el medio GEY (2% glucosa, 5% etanol, 1% extracto de levadura), que puede ser

usado como caldo de enriquecimiento y como medio sólido con el agregado de 1,5% de agar (Seearunruangchai et al. 2004; Tanasupawat et al. 2009).

La adición de carbonato de calcio (CaCO_3) a los medios GYC y GEY convierte a estos últimos en medios diferenciales para BAA, ya que pone en evidencia el metabolismo de la fuente de carbono (glucosa, etanol respectivamente) con producción de ácido acético, el cual disuelve el CaCO_3 , formando un halo transparente alrededor de la colonia (Yamada et al. 1976; Tanasupawat et al. 2004; Valera et al. 2011).

Los requerimientos nutricionales y condiciones de crecimiento de las BAA, hacen factible el desarrollo de hongos y bacterias del ácido láctico, por lo cual es difícil obtener cultivos puros. Para subsanar este inconveniente se usan sustancias inhibitorias y/o condiciones adversas para los microorganismos contaminantes.

Así, para inhibir el desarrollo de mohos y levaduras, los medios de cultivo se suplementan con la adición de piramicina (100 mg/L) (Joyeux et al. 1984; Du Toit y Pretorius 2002; González 2005; Valera et al. 2011) o cicloheximida (100 mg/L) (Lisdiyanti et al. 2000, 2001, 2002); y se agrega penicilina (3 U/mL) para impedir el crecimiento de las bacterias lácticas, ajustando el pH a 4,5 (Joyeux et al. 1984; Ruiz et al. 2000; Du Toit y Pretorius 2002).

En este trabajo se recurrió al uso de sorbato de potasio agregado al medio GEY - CaCO_3 para inhibir mohos y levaduras. Si bien la acción inhibitoria de los sorbatos frente a bacterias es menos intensa y afecta a un menor número de especies (Sofos y Busta 1993), las bacterias del ácido láctico ven restringido su crecimiento, principalmente por las condiciones ambientales desfavorables (pH, tensión de O_2 , etc.).

Para cultivar bacterias procedentes de vinagres con elevadas concentraciones de ácido acético (10-15%) se utilizan medios con doble capa de agar (0,5% en el fondo y 1% en la superficie), como el medio AE (ácido acético-etanol) y el medio RAE (ácido acético-etanol reforzado) (Entani et al.

1985; Sokollek y Hammes 1997; Sokollek et al. 1998a; 1998b; Schuller et al. 2000). Estos medios, al incluir ácido acético y etanol en su composición, simulan el ecosistema de las bacterias (vinagre) y por tanto favorecen su aislamiento y desarrollo en placas. Asimismo, se ha descrito un medio, que simula, aún mejor, el hábitat de las BAA en el inicio del proceso de acetificación, el medio V50 (medio vino sintético) (Quintero et al. 2004).

Las BAA pueden oxidar azúcares, alcoholes azucarados y alcoholes a sus correspondientes ácidos. Estas características fenotípicas son variables dependiendo del género y pueden ser usadas para diferenciar géneros (Komagata et al. 2014).

3.1.2 CUANTIFICACION

La cuantificación de BAA procedentes de distintas muestras (vino, vinagre, etc.) se ha hecho mediante dilución y recuento de colonias en medios de cultivo sólidos. Sin embargo, la recuperación de los microorganismos es limitada (Sievers et al. 1992; Sokollek et al. 1998b; Trcek 2005); aceptándose que el cultivo en placa sólo revela una pequeña porción de la verdadera población microbiana presente (Mandigan et al. 2009). En el caso del vinagre, aún no se ha encontrado ningún medio capaz de recuperar en placa el mismo número de microorganismos que lo cuantificado en el microscopio (Trcek 2005; Baena-Ruano et al. 2006; Torija et al. 2010). La pobre recuperación se ha asociado a la formación de agregados y a la presencia de células en el estado "viable no cultivable" (VNC). Debido a su metabolismo aerobio, las BAA tienden a agregarse para permanecer en la superficie del líquido formando un velo o madre del vinagre. Estos agregados hacen dificultosa la cuantificación de BAA en medios de cultivos (Janssen et al. 2002; Ilabaca et al. 2008). En el estado "viable no cultivable" (VNC), las células no pueden crecer en medios de cultivo rutinarios para dar lugar a colonias visibles y poder cuantificar, sin embargo están vivas y tienen actividad metabólica (Millet y Lonvaud-Funel 2000). Las

causas para que una célula llegue al estado VNC pueden ser: la inanición, incubación fuera del rango de temperatura de crecimiento, elevadas concentraciones osmóticas, poca disponibilidad de oxígeno, exposición a la luz blanca (Oliver 2005).

Debido a la imposibilidad de cuantificar las BAA mediante métodos de cultivo, recientemente se han desarrollado numerosas técnicas independientes del cultivo para estimar la población (viable y no viable) de BAA en vinos y vinagres. Algunas de estas técnicas son: la epifluorescencia (DEFT, direct epifluorescence filter technique) (Mesa et al. 2003; Blasco et al. 2003; Baena-Ruano et al. 2006) la PCR cuantitativa (RT-PCR) (González et al. 2006; Vegas et al. 2013) y el FISH (Fluorescence in situ hybridization) (Blasco et al. 2003).

3.1.3. FRUTAS DE LA REGIÓN DE SALTO GRANDE

En las últimas décadas la producción frutícola de Argentina se ha posicionado como uno de los sectores más dinámicos de la agricultura conformando regiones que producen en contra-estación para los principales mercados consumidores del hemisferio Norte (Palacios 2010). Aunque esto resulta beneficioso porque permite comercializar productos como "primicia", también debe competir con otros países oferentes.

La denominada región de Salto Grande comprende los departamentos de Concordia, Federación, San Salvador, Colón y Concepción del Uruguay. Los complejos productivos más significativos de la zona son el citrícola, forestal, la apicultura, la producción de frutas finas (principalmente arándanos) (Figura 3.1), turístico termal y en menor medida los complejos avícola y arrocero. La actividad citrícola se concentra en los departamentos del norte, fundamentalmente en Federación y Concordia.

3.1.3.1 Cítricos

En la provincia de Entre Ríos (Argentina), la citricultura se localiza en la franja de suelos arenosos existentes sobre la margen occidental del Río Uruguay, en los departamentos Concordia, Federación y norte de Colón. En esta región predominan las plantaciones de mandarina y naranja, el pomelo y el limón tienen una participación poco significativa. De las diferentes variedades de naranja merecen destacarse New Hall, Washington Navel, Salustiana y Valencia. La producción cítrica de mayor importancia son las naranjas –que ocupan el 48% de la superficie cítrica implantada– y en segundo lugar, las mandarinas. En menor proporción también se producen pomelos y limones (Vera y Díaz Vélez 2013). La industria de procesamiento de cítricos se encuentra fuertemente concentrada en el departamento Concordia. Los principales destinos de la fruta cítrica de la provincia pueden estimarse en la Tabla 3.1.



Figura 3.1 Frutas regionales: naranjas y arándanos

De la información detallada en la Tabla 3.1 se desprende que la fruta cítrica se comercializa principalmente en fresco y en el mercado interno. El resto se destina a industria y exportación en proporciones que fluctúan según los años, en función de la oferta/demanda del mercado doméstico y externo y

de la calidad de la fruta; y lógicamente, si el mercado interno se satura, la fruta se canaliza hacia la industria. El ciclo productivo se extiende desde marzo a diciembre, con picos de máxima actividad entre mayo y noviembre.

Tabla 3.1 Variación de la participación relativa de los destinos de fruta de Entre Ríos 2009/13

	2009	2010	2011	2012	2013
Industria	15%	20%	16%	25%	15%
Mercado interno	67%	58%	64%	60%	68%
Exportación	18%	22%	20%	15%	17%

Fuente: elaboración propia INTA EEA Concordia (Vera y Díaz Vélez 2013)

La superficie de las frutas cítricas contiene alrededor de 4 log UFC/cm² de microorganismos aeróbicos. Dentro de los organismos aeróbicos, se encuentran las bacterias acidúricas, entre ellas, las BAA (Pao y Davis 2001).

Las frutas frescas tienen un revestimiento impermeable recubierto de cera protectora o de la piel, que funciona como una barrera para la entrada de la mayoría de los microorganismos patógenos de plantas. Sin embargo, la piel de la fruta alberga una microbiota natural, que es variada e incluye bacterias y hongos (Hanklin y Lacy 1992). Estos microorganismos continúan en las superficies de la fruta, siempre y cuando las cubiertas permanezcan sanas, cualquier corte o moretones que aparecen después de la cosecha permiten la entrada de los microorganismos de los tejidos internos menos protegidos. Sin embargo, dependiendo de la composición específica de la fruta (polisacáridos, azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales), algunos microorganismos presentes en la microbiota de fruta natural podrían persistir durante su procesamiento (Kalia y Gupta 2006). Estos microbios luego podrían convertirse en las poblaciones dominantes en el mosto e iniciar la fermentación o acetificación.

3.1.3.2 Arándanos

El arándano fue introducido en la Argentina en la década de los '90 impulsada por la existencia de una demanda insatisfecha en el Hemisferio Norte y los buenos precios del mercado. Su cultivo ha crecido a ritmo sostenido, particularmente en la región ubicada sobre el margen del río Uruguay, en el departamento Concordia, en la provincia de Entre Ríos, concentrando más del 40% de la producción de arándanos en el país (Forbes et al. 2009). Las principales variedades que se cultivan en nuestra región son del tipo "highbush": O'Neal, Misty, Millennia y Jewel, entre otras.

En los últimos años ha habido un rápido incremento en la superficie implantada con arándanos, en el año 2013 había cultivadas 3100 hectáreas (Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina, APAMA), esto se debe principalmente a los buenos precios de exportación de las bayas a contra estación a los países de Europa y EEUU, y además al aumento de la demanda a nivel mundial de esta fruta.

La producción de arándanos en el año 2014 presentó niveles superiores al año 2013, debido principalmente a las condiciones meteorológicas que acompañaron al sector y por otro lado, esta situación llega como consecuencia de una visión, una confianza y un gran compromiso de los productores que, atentos a los avances tecnológicos de los viveristas y mejoradores de plantas, invirtieron en el recambio varietal (Stabile 2015).

Sin embargo, no todas las campañas fueron exitosas. Por ejemplo, en el año 2013, la exportación de los frutos frescos alcanzó el 85%, el mercado interno, tanto para consumo en fresco como industrialización, el 10% y el 5% se descartó (Zapata 2014). El elevado descarte es provocado por diversos factores, entre los que se destacan, la caída de los precios de exportación por la alta productividad, la selectividad de la demanda, enfermedades o defectos de los frutos, granizo, etc.

El bajo consumo interno de arándanos se debe a que no forman parte de los hábitos de consumo de la población argentina y tampoco se han desarrollado campañas que lo promuevan.

Surge la necesidad de pensar en alternativas para industrializar los excedentes, que año a año son cada vez mayores. La obtención de vinagre a partir de arándano puede ser una alternativa de proceso, y para esto es necesario contar con un cultivo iniciador caracterizado.

Los bacilos acidúricos oxidantes de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que forman parte de la flora normal de las frutas, tienen un rol muy importante en la alteración de las mismas y de bebidas alcohólicas pues oxidan el etanol y los azúcares (Mossel et al. 2003). Debido a la habilidad de los microorganismos para internarse en los tejidos de frutas y hortalizas (Ibarra-Sanchez et al. 2004; Raj et al. 2005), es factible encontrar las bacterias de la microbiota en tejido de la epidermis y mesocarpio de las frutas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MUESTREO

Se utilizaron arándanos maduros de las variedades: O´Neal, Bluquinex, Misty, Millennia y Jewel y frutas cítricas: mandarina Nova, mandarina Clementina, naranja New Hall, naranja Navel y naranja Navel Alargada, provenientes del departamento Concordia.

Las muestras de arándanos se tomaron durante los meses de cosecha: octubre, noviembre y diciembre. En el laboratorio, se lavaron y se procesaron en Stomacher IUL Instruments (España), durante 1 minuto, de manera que se

rompa el fruto y lograr un mejor contacto con el medio de transporte utilizado para recuperar las bacterias, y por otra parte, enriquecer con los nutrientes propios de la fruta. Posteriormente se sembró en los caldos de enriquecimiento.

Las muestras de frutas cítricas se tomaron en el mes de mayo. En el laboratorio las frutas se lavaron y se procesaron para su análisis de la siguiente manera:

- Aislamiento de bacterias del exterior de la fruta: se cortaron las frutas en trozos y se maceraron en 100 mL de agua de peptona (0,5%). Se los dejó reposar aproximadamente media hora. Se sembró el sobrenadante en los caldos de enriquecimiento.

- Aislamiento de bacterias del jugo: las frutas se cortaron en mitades, se exprimió el jugo con exprimidor manual y se sembró una alícuota del mismo en los caldos de enriquecimiento.

- Aislamiento de bacterias del jugo fermentado: 20 mL de cada muestra de jugo de frutas se dejó en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C durante aproximadamente 15 días, para lograr una fermentación espontánea de los mismos. Posteriormente, una alícuota de los mismos se sembró en los caldos de enriquecimiento.

3.2.2 MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO Y DE AISLAMIENTO

Se emplearon tres medios de cultivo como caldos de enriquecimiento, cuya composición se muestra en la Tabla 3.2. Los medios I, II y III han sido usados por Seearunruangchai et al. (2004), Lisdiyanti et al. (2003) y Moonmangmee et al. (2003), respectivamente.

Varios investigadores que han trabajado en el aislamiento de BAA recomiendan agregar a los caldos de enriquecimiento al momento de ser utilizados, una solución estéril de piramicina y/o cicloheximida de manera de

obtener una concentración final de 0,01% (González et al. 2005; González 2005; Ruiz et al. 2000; Yamada et al. 2000; Lisdiyanti et al. 2003). Como en ensayos previos se comprobó que con el uso de 200 ppm de sorbato de potasio se obtenían resultados favorables, es decir se lograba la inhibición de mohos y levaduras, se optó por añadir este micostático en lugar de los originales.

Tabla 3.2 Composición de Caldos de Enriquecimiento

	Medio I	Medio II	Medio III
Glucosa %(m/v)	2	1	1
Etanol %(v/v)	5	0,5	1
Manitol %(m/v)			1
Extracto de levadura %(m/v)	1	0,8	0,2
Peptona %(m/v)		1,5	0,2
Ácido acético %(v/v)		0,3	
	pH= 4,5	pH= 3,5	pH=4,5

El enriquecimiento se hizo en tubos de ensayos donde se colocaron 7 mL de cada medio y 7 g de muestra para el caso de los arándanos y 7 mL para las frutas cítricas (sobrenadante, jugo de fruta y jugo fermentado de fruta). Se incubaron durante 3 días en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C, en condiciones aeróbicas.

El posterior aislamiento, se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 100 µL de cada tubo y se sembraron en placas de Petri con agar GEY-CaCO₃, (2% glucosa, 5% (v/v) etanol, 1% extracto de levadura, 1,5% agar y 0,3% CaCO₃) (Seearunruangchai et al. 2004). Se incubaron en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C durante 10 días. Las bacterias del ácido acético fueron reconocidas por la formación de halos claros alrededor de las colonias, producto de la disolución del CaCO₃ por la acidificación del medio.

Las colonias de bacterias identificadas a priori como BAA, fueron repicadas en agar GEY-CaCO₃ e incubadas a 30 ± 1 °C durante 72 horas para confirmar que las mismas formaban parte de la familia *Acetobacteracea*. Para

ello se realizaron pruebas preliminares, consistente en observación de morfología de las células, actividad catalasa y actividad citocromo c oxidasa.

3.2.3 PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONFIRMAR FAMILIA *Acetobacteracea*.

3.2.3.1 Morfología celular y movilidad

Para observar la morfología y la movilidad de las bacterias, éstas fueron inoculadas en agar GEY-CaCO₃ e incubadas por 48 horas a 30±1 °C. Posteriormente se realizó tinción de Gram, se observó en microscopio con aumento de 1000X y se midió el tamaño de las bacterias mediante micrómetro ocular incorporado al mismo. La movilidad se examinó mediante técnica de "gota pendiente" con aumento de 1000X, en microscopio óptico Leica DME (Estados Unidos).

3.2.3.2 Catalasa

Para determinar la presencia de la enzima catalasa, se colocó una porción de la colonia aislada en agar GEY-CaCO₃, sobre un portaobjeto limpio y seco se añadieron dos gotas de reactivo (3% H₂O₂) (Gamazo et al. 2005). Si se observa un burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de O₂, y esto se interpreta como presencia de la enzima catalasa.

3.2.3.3 Citocromo c oxidasa

Para detectar la presencia de citocromo c se utilizaron discos de papel impregnado con oxalato de p-aminodimetilanilina (Britania). Se realizó una suspensión de bacterias en 0,2 mL de agua destilada estéril y sobre ésta se depositó un disco. La aparición de color fucsia en la suspensión bacteriana se interpreta como reacción positiva (Gamazo et al. 2005).

3.2.4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS O ESTUDIO FENOTÍPICO

3.2.4.1 Oxidación de acetato y lactato

Se inocularon las bacterias en estudio en un medio con 0,3% de peptona, 0,2% de extracto de levadura, 0,2% de acetato/lactato de sodio y 0,002% de azul de bromotimol. El pH se ajustó a 6,4. Se incubaron durante 7 días en estufa Faeta (Argentina), a 30 ± 1 °C. El cambio de color (de verde a azul), producido por la alcalinización del medio debida a la oxidación del sustrato se interpretó como prueba positiva (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.2 Formación de ácido a partir de azúcares y alcoholes

Las bacterias se inocularon en un medio con 0,5% de extracto de levadura, 0,002% de púrpura de bromocresol y 1% de azúcar/alcohol. Se incubaron durante 7 días en estufa Faeta (Argentina), a 30 ± 1 °C (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976). Se ensayaron los siguientes azúcares y alcoholes: L-arabinosa, D-arabinosa, L-ramnosa, D- manosa, L-sorbosa, melibiosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, rafinosa, D-manitol, D-sorbitol, dulcitol, glicerol, etanol y propanol. El cambio de color (de púrpura a amarillo), producido por la acidificación del medio debida a la oxidación del sustrato se interpretó como prueba positiva (Lisdiyanti et al. 2002).

3.2.4.3 Crecimiento a 30 ± 1 °C, 37 ± 1 °C y 40 ± 1 °C

Se utilizó un medio con 1% de glucosa, 0,5% (v/v) de etanol, 0,5% de extracto de levadura y 0,3% de peptona. El pH se ajustó a 6,8. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C, 37 ± 1 °C y 40 ± 1 °C respectivamente, durante 7 días. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm

con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.4 Crecimiento a pH 3,5; 4,0 y 4,5

Se usó un medio con 2% de glucosa, 0,5% (v/v) de etanol, 0,5% de extracto de levadura y 0,3% de peptona. El medio se ajustó a pH 3,5; 4,0 y 4,5 respectivamente con HCl. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C durante 7 días. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.5 Crecimiento en agar manitol

Se observó el crecimiento de las bacterias en un medio formado por 2,5% de manitol, 0,5% extracto de levadura, 0,3% de peptona y 2% de agar. El pH se ajustó a 6,0. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30 ± 1 °C (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.6 Crecimiento en agar glutamato

Se observó el crecimiento de las bacterias en el medio formado por 0,5% de glutamato de sodio, 0,5% extracto de levadura, 0,3% de peptona y 2% de agar. El pH se ajustó a 6,0. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30 ± 1 °C (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.7 Crecimiento con metanol como fuente de C

Se ensayó la asimilación de metanol en el medio Hoyer-Frateur: 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% de K_2HPO_4 , 0,09% de KH_2PO_4 , 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3% (v/v) de metanol. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 7 días a 30 ± 1 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (De Ley y Frateur 1974; Yamashita et al. 2004).

3.2.4.8 Crecimiento en 0,35% (v/v) de ácido acético

Se inocularon las bacterias en el medio que contenía 1% de glucosa, 0,3% extracto de levadura, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de malta y 0,35% (v/v) de ácido acético. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30 ± 1 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Yamashita et al. 2004).

3.2.4.9 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol

Se observó la formación de dihidroxiacetona en el medio que contenía 3% de glicerol, 0,5% de extracto de levadura, 1% de peptona y 1,5 % de agar, el pH se ajustó a 6,0 y se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30 ± 1 °C. Después de incubar se agregó solución de Fehling sobre la superficie de la placa de Petri. La aparición de un color naranja oscuro pone de manifiesto la presencia de dihidroxiacetona (Asai et al. 1964; Yamada et al. 1976).

3.2.4.10 Crecimiento en 1% KNO₃

Se inoculó sobre un medio de cultivo que contenía 1% de glucosa, 0,3% extracto de levadura, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de malta y 1% de KNO₃. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30±1 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Yukphan et al. 2005).

3.2.4.11 Crecimiento en 3% de NaCl

Se inoculó sobre un medio de cultivo que contenía 1% de glucosa, 0,3% extracto de levadura, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de malta y 3% de NaCl. Se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30±1 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Yukphan et al. 2005).

3.2.4.12 Crecimiento en 30% de glucosa

En el siguiente medio: 1% de glucosa, 0,3% extracto de levadura, 0,5% de peptona, 0,3% de extracto de malta y 30% de glucosa, se sembró la bacteria en estudio, y se incubó en estufa Faeta (Argentina) durante 10 días a 30±1 °C. El crecimiento se evaluó midiendo densidad óptica a 540 nm con espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603 (Japón) (Yamashita et al. 2004).

3.2.4.13 Oxidación de etanol a CO₂

Se utilizaron cultivos inclinados de agar levadura etanol verde de bromocresol, cuya composición es: 3% de extracto de levadura, 0,0022% verde de bromocresol y 3,85% (v/v) de etanol. Se incubaron durante 10 días en estufa Faeta (Argentina) a 30±1°C. La producción de ácido acético a partir de

etanol se observa por el cambio de color del medio (amarillo) y la oxidación posterior del ácido formado, a CO₂ y H₂O por un nuevo cambio de color (verde azulado)(Harrigan y Mc. Cance 1979).

3.2.4.14 Determinación de quinonas

Las bacterias se inocularon en erlenmeyers conteniendo 200 mL del siguiente caldo: 2% glucosa, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,2 % peptona y 0,2% extracto de levadura. Se incubaron en estufa Faeta (Argentina) a 30±1 °C, con inyección de aire, durante 48 horas (Yamada et al. 1969).

Para la extracción de quinonas se centrifugó el cultivo de bacterias en una centrífuga Boeco modelo C-28 (Alemania), a 4000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y las células fueron depositadas en una cápsula de porcelana, previamente tarada, para su deshidratación. Se utilizó estufa a 40±1 °C y 50 mm Hg de vacío. Una vez deshidratadas, las células fueron colocadas en un vaso de precipitado, se le agregó 20 mL de una mezcla de cloroformo–metanol (2:1 v/v) y se dejó en agitación durante 20 horas, cubierta con papel aluminio. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 30 minutos, se tomó con pipeta el sobrenadante y se lo colocó en un tubo de ensayo. Se evaporó todo el solvente con gas N₂. El residuo se re-suspendió en 0,5 mL de acetona (Tanasupawat et al. 2009).

Para determinar la presencia de las quinonas se utilizó cromatografía en papel. Las muestras eluyeron junto con el patrón de ubiquinona Q10. El solvente utilizado fue una mezcla de cloroformo – metanol (70:30 v/v). Para el revelado de la cromatografía se utilizó una solución de permanganato de potasio al 0,2% (Yamada et al. 1969).

3.2.5 CONSERVACIÓN

Como método de conservación para posteriores estudios se empleó la congelación en freezer Patrick (Argentina) a (-18 °C) en un caldo que contenía 2% de glucosa; 0,5% v/v de etanol; 0,8% de extracto de levadura; 0,5% de peptona, usando glicerol 20 % v/v como crioprotector (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2003).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 AISLAMIENTO DE BAA A PARTIR DE ARÁNDANOS

Se analizaron 39 muestras de arándanos de las variedades: O'Neal, Bluquinex, Misty, Millennia y Jewel. En la Tabla 3.3 se pueden observar las BAA aisladas de las distintas variedades de arándanos, en medio GEY-CaCO₃; las cuales habían sido previamente recuperadas en tres medios de enriquecimiento diferentes.

Como puede observarse en la Tabla 3.3, la variedad de arándanos más investigada fue O'Neal, por ser esta la predominante en la zona, ya que tiene, en general, bajos requerimientos de horas de frío y presenta una productividad media-alta (Forbes et al. 2009), obteniéndose de ella 9 BAA. La variedad Millennia fue una fuente importante de estas bacterias, ya que se aislaron 8 BAA. De las variedades Jewel, Bluquinex y Misty se aislaron 4, 3 y 3 BAA, respectivamente.

Tabla 3.3 Origen de BAA aisladas a partir arándanos

Muestra	Variedad Arándano	Medios de enriquecimiento			Aislados
		Medio I	Medio II	Medio III	
1	O'Neal	-	-	-	
2	Misty	-	-	-	
3	O'Neal	-	-	-	
4	Bluquinex	-	-	2	A10 - A20
5	O'Neal	-	-	-	
6	O'Neal	1	-	-	A30
7	O'Neal	-	-	-	
8	Misty	-	-	-	
9	O'Neal	1	-	-	A40
10	O'Neal	1	-	-	A50
11	O'Neal	-	-	-	
12	Millennia	-	-	-	
13	Millennia	-	-	-	
14	Millennia	-	-	1	A60
15	O'Neal	-	-	-	
16	Bluquinex	-	-	-	
17	Bluquinex	-	-	-	
18	O'Neal	-	-	-	
19	Misty	-	-	-	
20	Misty	-	-	-	
21	Bluquinex	-	-	-	
22	Bluquinex	-	-	-	
23	O'Neal	-	-	-	
24	O'Neal	-	-	-	
25	Misty	-	-	-	
26	Bluquinex	-	1	-	A70
27	Millennia	2	1	-	A170 - A180 - A80
28	Millennia	1	2	-	A90 - A190 - A200
29	Jewel	-	2	1	A100 - A110 - A120
30	Jewel	1	1	-	A160 - A130
31	O'Neal	1	1	-	A140 - A 220
32	O'Neal	1	1	-	A150 - A210
33	Misty	-	-	-	
34	O'Neal	1	-	-	A230
35	Jewel	-	-	-	
36	O'Neal	-	-	-	
37	Misty	1	-	2	A250 - A240 - A260
38	O'Neal	-	1	-	A270
39	Jewel	-	-	-	
Totales		11	10	6	

Aislamiento de BAA en agar GEY-CaCO₃ a partir de distintos medios de enriquecimientos. Las composiciones de los caldos de enriquecimientos están detalladas en la Tabla 3.2. Abreviación: A: bacterias aisladas de arándanos.

En la amplia bibliografía consultada no se han encontrado estudios de BAA en arándanos, debido fundamentalmente a que los principales investigadores de estas bacterias han estudiado la microbiota de flores, frutas y alimentos fermentados de su región (Indonesia, Tailandia, Japón), todas zonas tropicales donde los arándanos no tiene posibilidades de desarrollarse, debido a las condiciones climáticas.

3.3.2 AISLAMIENTO DE BAA A PARTIR DE FRUTAS CÍTRICAS

Se analizaron 7 muestras de frutas cítricas: mandarinas de la variedades Nova y Clementina y naranjas de las variedades New Hall, Navel Alargada y Navel, todas ellas obtenidas de plantaciones del departamento Concordia. De las mismas se obtuvieron 9 BAA, de las cuales 8 se aislaron a partir del jugo fermentado. En la Tabla 3.4 se pueden ver las BAA aisladas en las distintas variedades de frutas cítricas en medio GEY-CaCO₃; las cuales habían sido previamente recuperadas en los diferentes medios de enriquecimiento utilizados.

Como se observa en la Tabla 3.4, no se aislaron BAA a partir de jugo de frutas cítricas, presumiblemente debido a la baja competitividad de estas bacterias frente a otros microorganismos. Sin embargo la fermentación espontánea de los jugos permitió una buena recuperación de bacterias acéticas; el etanol producido, selecciona las mismas disminuyendo la flora acompañante. En este sentido, Beheshti Maal et al. (2014) dejaron dátiles, duraznos y damascos, pasados de su estado de madurez óptima, sin carozos durante 7 días a 30 °C, con lo que provocaron una fermentación espontánea de los mismos y a partir de este mosto fermentado aislaron BAA que identificaron posteriormente (en todos los casos), como *Acetobacter* por su habilidad de oxidar completamente a CO₂ y H₂O el medio de Carr (3% extracto de levadura, 2% de etanol, 2% de agar y 0,002% de verde de bromocresol) (Beheshti Maal y Shafiee 2010, 2011; Beheshti Maal 2014)

Tabla 3.4 Origen de BAA aisladas a partir de frutas cítricas

Muestra	Variedad citrus	Medios de enriquecimiento			Aislados
		Medio I	Medio II	Medio III	
1	Mandarina Nova (cáscara)	1	-	-	C1
1	Mandarina Nova (jugo)	-	-	-	
1	Mandarina Nova (jugo fermentado)	-	-	-	
2	Mandarina Clementina (cáscara)	-	-	-	
2	Mandarina Clementina (jugo)	-	-	-	
2	Mandarina Clementina (jugo fermentado)	1	-	-	C2
3	Naranja Navel (cáscara)	-	-	-	
3	Naranja Navel (jugo)	-	-	-	
3	Naranja Navel (jugo fermentado)	1	-	-	C3
4	Naranja Navel (cáscara)	-	-	-	
4	Naranja Navel (jugo)	-	-	-	
4	Naranja Navel (jugo fermentado)	1	1	1	C4 - C5 - C6
5	Naranja Navel Alargada (cáscara)	-	-	-	
5	Naranja Navel Alargada (jugo)	-	-	-	
5	Naranja Navel Alargada (jugo fermentado)	2	-	-	C7 - C8
6	Naranja New Hall (cáscara)	-	-	-	
6	Naranja New Hall (jugo)	-	-	-	
6	Naranja New Hall (jugo fermentado)	-	-	-	
7	Naranja Navel Alargada (cáscara)	-	-	-	
7	Naranja Navel Alargada (jugo)	-	-	-	
7	Naranja Navel Alargada (jugo fermentado)	1	-	-	C9
Totales		7	1	1	

Aislamiento de BAA en agar GEY-CaCO₃ a partir de distintos medios de enriquecimientos. Las composiciones de los caldos de enriquecimientos están detalladas en la tabla 3.2. Abreviación: C: bacterias aisladas de frutas cítricas.

Se han informado pocos estudios de BAA a partir de frutas cítricas, en particular naranjas. Lisdiyanti (2001), en su investigación de BAA a partir de flores, frutas y alimentos fermentados recogidos en Indonesia, encontró 9 cepas de *Acetobacter* a partir de naranjas de Yogyakarta (Indonesia), utilizando un caldo de enriquecimiento que contenía 2% de sorbitol, que estudios bioquímicos y moleculares permitieron identificar como *A. tropicalis*. Por otro lado, utilizando el mismo caldo de enriquecimiento (sorbitol 2%), se encontraron cepas de *Gluconobacter*, aisladas de naranjas provenientes de Bangkok (Tailandia), que fueron identificadas como *G. oxidans* (Vu et al. 2007).

3.3.3 PRUEBAS PRELIMINARES PARA CONFIRMAR FAMILIA *Acetobacteriaceae*.

Tal como se ha indicado en el ítem 2 MATERIALES Y MÉTODOS (2.2. Medios de Enriquecimiento y de Aislamiento), el aislamiento de estas bacterias transcurrió en dos etapas: enriquecimiento en medios líquidos durante 3–4 días y el aislamiento propiamente dicho, en medios sólidos en placas. Las colonias de bacterias del ácido acético desarrolladas en placas de Petri con medio GEY-CaCO₃ fueron reconocidas por sus características macroscópicas: colonias blancas, de tamaño muy pequeño (1 a 2 mm), y con un halo claro a su alrededor, producto de la disolución del CaCO₃ por la acidificación del medio, ya que las bacterias transforman el etanol presente en ácido acético (Yamada et al. 1999; Seearunruangchai et al. 2004).

En la Figura 3.2 se observan las placas de Petri con colonias de BAA que fueron aisladas a partir de arándanos, en las cuales se puede ver el halo más claro alrededor de las mismas.

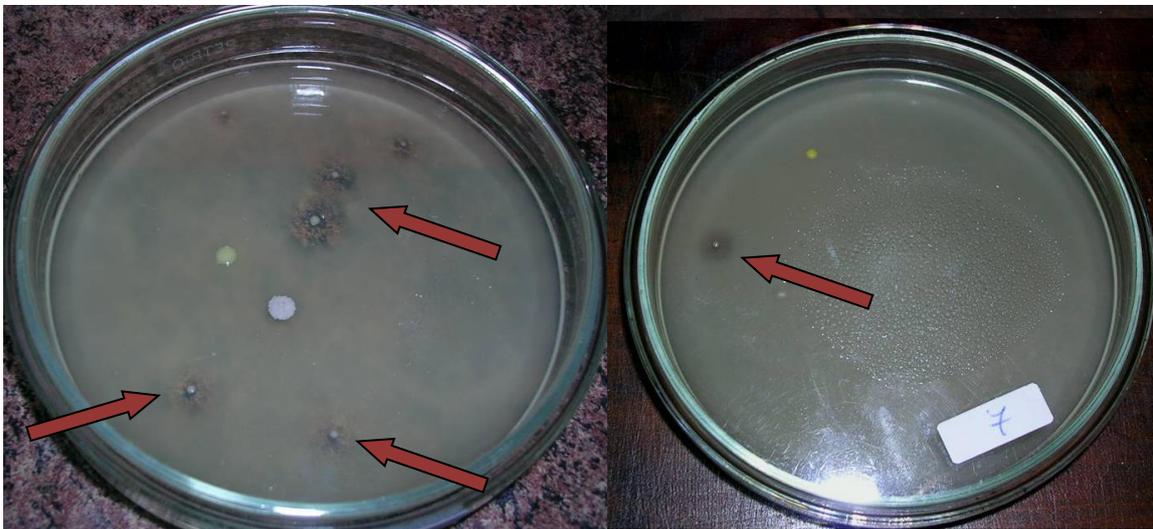


Figura 3.2 Colonias de BAA desarrolladas en agar GEY-CaCO₃.

Las colonias típicas de BAA (36) se repicaron en agar GEY-CaCO₃ para posteriores ensayos de identificación. Del estudio de la morfología celular, fue

posible distinguir bacilos Gram negativos, aislados, de a pares, o formando cadenas (Figura 3.3). El tamaño de los bacilos es variable, como se puede observar en las Tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5 Origen, tamaño y agrupación de las BAA aisladas de arándanos

Aislado	Variedad	Tamaño (μm)	Agrupación
A10	Bluquinex	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	simples, de a pares
A20	Bluquinex	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	simples, de a pares
A30	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,5 - 1,8	de a pares
A40	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,0 - 1,2	simples, de a pares
A50	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,7 - 2,0	en cadenas, de a pares
A60	Millennia	1,0 - 1,2 x 3,0 - 4,0	de a pares
A70	Bluquinex	0,5 - 0,7 x 1,4 - 1,7	en cadenas, de a pares
A80	Millennia	0,8 - 1,0 x 1,5 - 1,7	de a pares
A90	Millennia	0,8 - 1,0 x 1,8 - 2,2	de a pares
A100	Millennia	0,8 - 1,0 x 1,8 - 3,0	simples
A110	Yewel	0,5 - 0,8 x 1,2 - 2,0	de a pares
A120	Yewel	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,8	simples
A130	Yewel	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,4	de a pares
A140	O'Neal	0,6 - 0,7 x 1,2 - 1,7	simples
A150	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	simples, de a pares
A160	Yewel	0,5 - 0,6 x 1,2 - 1,4	simples, de a pares
A170	Millennia	0,5 - 0,8 x 1,4 - 1,8	de a pares
A180	Millennia	0,5 - 0,6 x 1,2 - 1,4	simples, de a pares
A190	Millennia	0,5 - 0,6 x 1,2 - 1,4	simples, de a pares
A200	Millennia	0,5 - 0,6 x 1,2 - 1,4	simples, de a pares
A210	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,2 - 2,0	en cadenas, de a pares
A220	O'Neal	0,6 - 0,7 x 1,2 - 1,4	simples, de a pares
A230	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	de a pares
A240	Misty	0,5 - 0,8 x 1,4 - 1,8	simples, de a pares
A250	Misty	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	de a pares
A260	Misty	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	simples, de a pares
A270	O'Neal	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,5	simples, de a pares

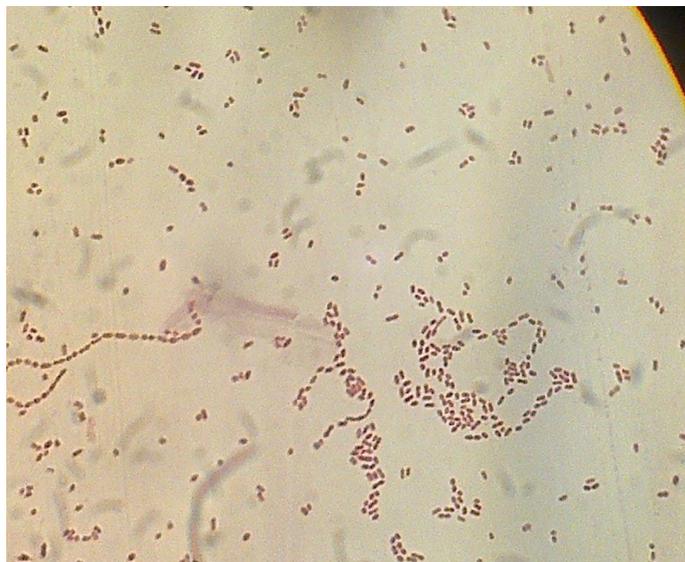
Abreviación: A bacterias aisladas de arándanos

Tabla 3.6 Origen, tamaño y agrupación de las BAA aisladas de frutas cítricas

Aislado	Variedad	Tamaño (µm)	Agrupación
C1	Mandarina Nova	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,5	simples, de a pares
C2	Mandarina Clementina	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,5	simples, de a pares
C3	Naranja Navel	0,7 - 1,0 x 1,5 - 2,0	simples, de a pares
C4	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,0	en cadenas, de a pares
C5	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,5 - 2,0	en cadenas, de a pares
C6	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,4 - 1,5	en cadenas, de a pares
C7	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,7	simples, de a pares
C8	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,7	simples, de a pares
C9	Naranja Navel Alargada	0,5 - 0,7 x 1,2 - 1,7	simples, de a pares

Abreviación: C bacterias aisladas de frutas cítricas

Figura 3.3 Bacterias del ácido acético con tinción de Gram, 1000X.



Todas son catalasa positiva y oxidasa negativa, estas pruebas bioquímicas confirman que las bacterias estudiadas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*.

3.3.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Para la identificación de las bacterias se tuvieron en cuenta los resultados de las pruebas bioquímicas, los cuales se compararon con los publicados por otros investigadores (Jojima et al. 2004; Yukphan et al. 2004a, 2004b, 2005, 2008, 2009, 2011; Tanasupawat et al. 2004, 2009; Kersters et al. 2006; Malimas et al. 2008a, 2008b, 2008c, 2013; Yamada y Yukphan 2008; Vu et al. 2013). El resultado de estas pruebas se muestra en la Tabla 3.7.

De las 36 colonias aisladas, 13 fueron asignadas al género *Acetobacter*, las mismas oxidaron intensamente el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O y la ubiquinona principal es Q9 (Malimas et al. 2013). Cinco fueron asignadas al género *Gluconobacter*, no oxidaron el acetato y el lactato, presentaron como ubiquinona principal, Q10, crecieron en presencia de 0,35% (v/v) de ácido acético y no lo hicieron en glucosa al 30%; produjeron ácidos a partir del D-manitol y el D-sorbitol (Yukphan et al. 2009, 2011; Malimas et al. 2013). Siete colonias se asignaron al género *Asaia*, estas mostraron una débil oxidación del acetato y el lactato, presentaron Q10 como principal ubiquinona, no crecieron en presencia de 0,35% (v/v) de ácido acético y no produjeron ácido acético en caldos con 1% de etanol. Sin embargo, análogamente a lo expresado por algunos autores se observó la producción de ácido acético a partir del etanol presente en el agar GEY-CaCO₃. (Malimas et al. 2008a; Tanasupawat et al. 2009). Cinco colonias fueron identificadas como pertenecientes al género *Acidomonas*, estas oxidaron el acetato a CO₂ y H₂O, pero no el lactato, utilizaron el metanol como única fuente de C y crecieron en presencia de 30% de glucosa y de 0,35% (v/v) de ácido acético (Yamashita et al. 2004; Malimas et al. 2013; Vu et al. 2013). Sólo un aislado fue identificado como *Gluconacetobacter* por oxidar el acetato y el lactato y presentar ubiquinona Q10 como principal ubiquinona. Cinco aislados se asignaron al género *Saccharibacter* por no oxidar el acetato y crecer en 30% de glucosa, a pesar que algunas características no coinciden exactamente con lo descrito por

Jojima (2004), quien encontró que este género oxida débilmente el lactato mientras en el presente estudio se observó que lo hace fuertemente.

Tabla 3.7 Características bioquímicas de las bacterias aisladas

	<i>Asaia</i>							<i>Ga.</i>	<i>Gluconobacter</i>				
	A10	A20	A60	A150	A230	A240	A260	A70	A80	A160	A180	C7	C8
Oxidación de acetato	D	D	D	D	D	D	D	+	-	-	-	-	-
Oxidación de lactato	D	D	D	D	D	D	D	+	-	-	-	-	-
Producción de AA a partir de E agar con CaCO ₃	D	D	D	D	D	D	D	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 0,35 % v/v de AA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar glutamato	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Crecimiento en 30% de D- glucosa	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
Crecimiento en 1% de KNO ₃	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	+	nd	nd
Crecimiento en 3% de NaCl	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	-	nd	nd
Crecimiento en metanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Producción de ácido a partir de:													
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-sorbosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
L-rhamnosa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Butanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+
Producción de cetonas a partir de Gli.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Oxidación de AA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 40 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a pH 3,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Crecimiento a pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a pH 4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Principal ubiquinona	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10

Abreviaciones: A, bacterias aisladas de arándanos; C. bacterias aisladas de frutas cítricas; *Ga.*, *Gluconacetobacter*; D, débil; -, negativo; +, positivo; nd, no determinado; AA, ácido acético; E, etanol; Gli, glicerol; Q10, ubiquinona 10.

Tabla 3.7 (continuación). Características bioquímicas de las bacterias aisladas

	<i>Acidomonas</i>					<i>Saccharibacter</i>				
	A30	A100	A110	A120	A170	A90	A130	A220	A250	A270
Oxidación de acetato	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Oxidación de lactato	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Producción de AA a partir de E agar con CaCO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 0,35 % v/v de AA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Crecimiento en agar manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar glutamato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 30% de D- glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 1% de KNO ₃	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
Crecimiento en 3% de NaCl	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd
Crecimiento en metanol	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
Producción de ácido a partir de:										
Etanol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propanol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D-manitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Producción de cetonas a partir de Gli.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidación de AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 40 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a pH 3,5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Crecimiento a pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a pH 4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Principal ubiquinona	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10	Q10

Abreviaciones: A, bacterias aisladas de arándanos; D, débil; -,negativo; +, positivo; nd, no determinado; AA, ácido acético; E, etanol; Gli, glicerol; Q10, ubiquinona 10.

Tabla 3.7 (continuación). Características bioquímicas de las bacterias aisladas

	<i>Acetobacter</i>												
	A40	A50	A140	A190	A200	A210	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C9
Oxidación de acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación de lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de AA a partir de E agar con CaCO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 0,35 % v/v de AA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+
Crecimiento en agar manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en agar glutamato	+	-	+	+	D	+	+	+	nd	nd	nd	+	nd
Crecimiento en 30% de D- glucosa	+	+	nd	nd	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	+	nd
Crecimiento en 1% de KNO ₃	+	-	nd	nd	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	+	nd
Crecimiento en 3% de NaCl	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	-	nd
Crecimiento en metanol	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd	nd
Producción de ácido a partir de:													
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	+	D	+	+	-	+	-
Propanol	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-manitol	-	-	-	-	-	-	-	D	+	+	+	+	-
D-sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
L-sorbosa	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
L-arabinosa	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Melibiosa	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
L-rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de cetonas a partir de Gli.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Oxidación de AA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37 °C	+	+	D	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Crecimiento a 40 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a pH 3,5	+	-	D	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Crecimiento a pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Crecimiento a pH 4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Principal ubiquinona	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9	Q9

Abreviaciones: A, bacterias aisladas de arándanos; C, bacterias aisladas de frutas cítricas; D, débil; -, negativo; +, positivo; nd, no determinado; AA, ácido acético; E, etanol; Gli, glicerol; Q9, ubiquinona 9.

Los aislados de arándanos A40, A50, A140, A190, A200, A210 y de frutas cítricas C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C9 fueron identificadas como *Acetobacter*. Este género se caracteriza por oxidar rápidamente el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O; *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* también posee esta característica, sin embargo, se las diferencia de *Acetobacter*, ya que ésta presenta ubiquinona Q9 y los otros géneros, poseen ubiquinona Q10 (Komagata et al. 2014). Todos los aislados crecieron en agar manitol y agar glutamato, excepto el A40 que no creció en agar manitol y A50 en agar glutamato. No obstante, hay discrepancia entre los autores respecto de esta prueba, mientras algunos reportan que *Acetobacter* no crece en agar glutamato y lo hace muy lentamente en agar manitol (Yukphan et al. 2005, 2009, 2011; Malimas et al. 2013), Iino et al. (2012a) afirman que no crece en agar glutamato, pero que el crecimiento en agar manitol es variable según la especie y otros afirman que crecen en agar glutamato y lentamente en agar manitol (Jojima et al. 2004; Greenberg et al. 2006). El aislado C2 fue el único que produjo ácido a partir de fructosa, lo que se opone a una de las características del género, que es la incapacidad para oxidar la fructosa (Lisdiyanti et al. 2000, 2001; Kersters et al. 2006; Yukphan et al. 2011). Las demás pruebas bioquímicas ensayadas, producción de ácidos a partir de azúcares y alcoholes, crecimiento a distintas temperaturas y pHs son variables de acuerdo a la especie de *Acetobacter*, por lo tanto no son características que permitan diferenciación de géneros (Lisdiyanti et al. 2000, 2001; Iino et al. 2012a; Komagata et al. 2014).

El aislado A70 se identificó como *Gluconacetobacter*. Sus propiedades bioquímicas son similares a *Acetobacter*, sin embargo como se dijo anteriormente, difiere de ésta, ya que presenta ubiquinona Q10 (Yamada y Yukphan 2008). Además presentó las siguientes características: oxidó el acetato y el lactato, creció en 0,35% (v/v) de ácido acético y produjo ácidos a partir de etanol, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, propanol, butanol, L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa y melibiosa (Jojima et al. 2004), creció en agar glutamato y en agar manitol (Lisdiyanti et al. 2006). A70 creció a 37 °C y no lo hizo a 40°C y pudo crecer a pH 4,5; 4,0 y 3,5. En muy pocos estudios se han encontrado

Gluconacetobacter a partir de frutas, ya que su principal hábitat es en los alimentos fermentados, especialmente el vinagre. Se ha aislado *Ga. liquefaciens* a partir de jugo de palma, de coco y de caña de azúcar (Seearunruangchai et al. 2004), *Ga. hansenii*, *Ga. liquefaciens*, *Ga. xylinus* y *Ga. europaeus* fueron aisladas durante el proceso de fermentación de vino (Gonzalez et al. 2004), Iino et al. (2012b) encontraron nuevas especies de *Gluconacetobacter* a partir del vinagre de caqui (fruta tradicional de Japón) y durante el proceso de acetificación de esta fruta se encontró *Ga. saccharivorans*, (Hidalgo et al. 2012), Slapsak et al. (2013) aislaron este género a partir del vinagre de malta, y *Ga. medellinensis* se aisló de vinagre de frutas caseras colombianas (Castro et al. 2013).

Los aislados A80, A160, A180, C7 y C8 se ubicaron en el género *Gluconobacter*, atendiendo a que no oxidaron el acetato y lactato; lo que permitió limitar la clasificación a 5 géneros, que también poseen ésta característica: *Gluconobacter*, *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Swingsia* y *Tanticharoenia*. Sin embargo, otras pruebas bioquímicas permitieron identificarlos, pues los 5 aislados crecieron en agar manitol y no crecieron en glucosa al 30% y en agar glutamato; por el contrario, los géneros *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Swingsia* se desarrollan en agar glutamato y en agar manitol y *Tanticharoenia* lo hace en agar manitol y débilmente en agar glutamato (Malimas et al. 2013), y *Gluconobacter* no crece en 30% de glucosa y si lo hacen los demás géneros antes mencionados (Yamada et al. 1999; Yukphan et al. 2008, 2009, 2011; Malimas et al. 2013). Además, los aislados identificados como *Gluconobacter*, produjeron ácidos a partir de glucosa, fructosa, galactosa, L-sorbosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa, sacarosa, manitol y sorbitol, lo cual es coincidente con las características encontradas por Yamada et al. (1999) en bacterias aisladas a partir de flores y frutas de Indonesia y que clasificó dentro del género *Gluconobacter*. Sin embargo, algunas características fueron diferentes respecto de lo reportado por Yamada (1999), por ejemplo, los aislados no produjeron ácidos a partir de glicerol, maltosa y melibiosa. En cuanto al crecimiento en distintas temperaturas y pH se obtuvieron los mismos

resultados que los reportados por otros autores, es decir, crecieron a 37 °C y no lo hicieron a 40 °C, y en los tres pH ensayados (Seearunruangchai et al. 2004; Tanasupawat et al. 2004, 2009).

Los aislados A30, A100, A110, A120, A170 fueron identificados como pertenecientes al género *Acidomonas* pues oxidaron el acetato pero no el lactato a y utilizaron el metanol como única fuente de C (Yamashita et al. 2004; Jojima et al. 2004; Yukphan et al. 2005, 2009). Además, crecieron en presencia de 30% de glucosa y en presencia de 0,35% (v/v) de ácido acético, lo que está de acuerdo con Yukphan et al. (2009; 2011) y Malimas et al. (2013), pero se opone a lo encontrado por Yukphan et al. (2005), ya que da negativo el test de crecimiento en 30% de glucosa. Además, produjeron ácidos a partir de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, melibiosa, L-arabinosa, D-arabinosa, dulcitol, etanol y D-sorbitol. Sin embargo, algunos de estos resultados no coincide con Yamashita et al. (2004). En cuanto al crecimiento en agar glutamato y agar manitol hay discrepancias en lo informado por diversos autores; Yukphan et al. (2005) y Greenberg et al. (2006) coinciden en que no los pueden utilizar como fuente de C, Yamashita et al. (2004) informan que no pueden utilizar el manitol y no dicen nada respecto del glutamato. Por su parte, otros autores reportan que no utilizan el glutamato y débilmente el manitol (Yukphan et al. 2009, 2011; Malimas et al. 2013). En cuanto a las temperaturas de crecimiento no crecieron a 40 °C y 37 °C; sin embargo se desarrollaron a todos los pH ensayados, lo cual coincide con (Yamashita et al. 2004).

Los aislados A90, A130, A220, A250 y A270 se identificaron como *Saccharibacter* oxidaron el lactato, pero no el acetato, esta característica no es compartida por ninguno de los otros géneros (Jojima et al. 2004; Yukphan et al. 2005, 2008, 2009, 2011; Cleenwerck y De Vos 2008; Malimas et al. 2013), lo que permitió una pronta identificación de las mismas. Además, estos aislados crecieron en glucosa al 30% y no lo hicieron en 0,35% (v/v) de ácido acético, y no acidificaron el etanol a ácido acético, lo que coincide con varios autores (Jojima et al. 2004; Yukphan et al. 2005, 2008, 2009, 2011; Cleenwerck y De

Vos 2008; Malimas et al. 2013). Se observaron diferencias respecto del crecimiento en agar manitol y en agar glutamato para este género en la bibliografía consultada. Los aislados del presente estudio crecieron utilizando el manitol y el glutamato como fuente de C, al igual que lo informado por (Yukphan et al. 2005, 2008, 2009). En cuanto a la acidificación de los azúcares, algunos aislados (A220, A250 y A270) acidificaron la mayoría de los azúcares ensayados, excepto la rafinosa, D- arabinosa y L-rhamnosa, lo que se opone a los datos informados por Jojima et al. (2004). Los aislados A90 y A130 no acidificaron, además de los mencionados anteriormente, L-sorbosa, y D-manitol (Jojima et al. 2004), crecieron sólo a pH 4 y 4,5 y no lo hicieron a pH 3,5; a las temperaturas de 37°C y 40°C, lo cual coincide con lo expresado por Jojima (2004).

Los aislados A10, A20, A60, A150, A230, A240 y A260 fueron identificados como *Asaia* porque oxidaron débilmente el acetato y el lactato, no se desarrollaron en presencia de 0,35% (v/v) de ácido acético y no acidificaron el etanol a ácido acético (Yukphan et al. 2005, 2011; Yamada y Yukphan 2008; Cleenwerck y De Vos 2008; Malimas et al. 2013). Éstas características muy particulares de éste género, respecto de otras BAA, permitieron una rápida identificación. Crecieron en agar glutamato y en agar manitol, lo cual coincide con muchos autores (Yamada et al. 2000; Katsura et al. 2001; Lisdiyanti et al. 2002; Yukphan et al. 2005, 2009, 2011; Malimas et al. 2013). Produjeron ácidos a partir de todos los azúcares y alcoholes ensayados, excepto a partir de rafinosa, D-arabinosa y melibiosa (Lisdiyanti et al. 2002), lo cual demuestra que éste género tiene capacidad oxidante versátil en cuanto a los azúcares y alcoholes azucarados, de manera similar a *Gluconobacter* (Yoshitaka et al. 2008). Algunas especies del género *Asaia* pueden crecer a temperaturas de 37 °C, de hecho es una prueba que se emplea para diferenciar especies (Suzuki et al. 2010), los aislados estudiados sólo crecieron a 30 °C.

Las BAA son bacterias mesófilas, tienen una temperatura óptima para el crecimiento en torno a los 30 °C. Comprobar el crecimiento de las BAA a

temperaturas superiores, por ej. 37 y 40 °C, que son las que se ensayaron en este estudio, permitiría encontrar cepas termotolerantes que podrían tener ventajas de uso en aplicaciones industriales, como por ejemplo el vinagre (Ndoye et al. 2006; Kanchanarach et al. 2010; Beheshti Maal 2014). En efecto, durante la fermentación, el calor que se genera como parte de la actividad biológica de las BAA, aumenta la temperatura en los bioreactores, por lo tanto, se requiere de un sistema de refrigeración para mantener la temperatura óptima para el crecimiento bacteriano y la producción de ácido acético (Saichana et al. 2014). El crecimiento de las BAA estudiadas a 40 °C fue negativa para todos los aislados, sin embargo, algunos de ellos agrupados en géneros conocidos como los utilizados para la producción de vinagres como *Acetobacter* (A40, A50, A190, A210, C3, C6 y C9), *Gluconacetobacter* (A70) y *Gluconobacter* (A80, A160, A180, C7 y C8) crecieron a 37 °C. Este ensayo, que si bien no es relevante para la identificación de géneros de BAA, pues varían entre especies del mismo género (Tanasupawat et al. 2009; Suzuki et al. 2010); adquiere importancia en el momento de caracterizar bacterias destinadas a ser utilizadas en procesos biotecnológicos, ya que cepas termotolerantes, que exhiben la capacidad de crecer a altas temperaturas, son deseables con el fin de reducir el costo de refrigeración para controlar el calor generado a partir de reacciones de fermentación que afectaría el crecimiento bacteriano y la producción de ácido acético.

La producción de dihidroxicetona a partir de glicerol fue uno de los primeros criterios adoptados para la diferenciación de las BAA de *Pseudomonas* (Carr y Shimwell 1961), es una característica que se da principalmente en algunas especies de el género *Gluconobacter* (Tanasupawat et al. 2009; Saichana et al. 2014), lo cual coincide con los resultados de este estudio, ya que los aislados identificados como *Gluconobacter* presentaron una reacción positiva a este ensayo. Sin embargo, los géneros *Asaia*, *Acetobacter* y *Kozakia* también pueden oxidar el glicerol (Yukphan et al. 2004a; Sievers y Swings 2005), el aislado C4 identificado como *Acetobacter* también pudo oxidar el glicerol y por otro lado, Nabe et al. (1979) utilizaron *A. xilinus* (hoy

Komagatabaeiter xylinus) para oxidar el glicerol y obtener dihidroxiacetona. En la industria química se utiliza la oxidación de glicerol, catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa presente en la membrana celular de *G. oxidans*, para obtener dihidroxiacetona de uso farmacéutico (Gupta et al. 2001; Stasiak y Błażej 2009).

Todos los aislados asignados al género *Acetobacter*, excepto A50, oxidaron el ácido acético formado a partir del etanol, es decir son bacterias superoxidantes, es decir que una vez agotado el etanol continúan su actividad oxidando el ácido acético previamente formado, y lo hacen en ausencia de etanol, ya que éste inhibe y reprime las enzimas involucradas (Du Toit y Pretorius 2002; Gullo y Giudici 2008). En cambio, el género *Gluconobacter*, no lo puede realizar ya que carece de dichas enzimas, (α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) y por lo tanto no tiene funcional el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Du Toit y Pretorius 2002). Esta característica, presente en algunas BAA, permite diferenciar los géneros, sin embargo no es deseada en la industria del vinagre, debido a que provoca grandes pérdidas de ácido acético y consecuentemente pérdidas de rendimiento del proceso.

Uno de los objetivos de la presente tesis es "Desarrollar un cultivo iniciador de bacterias del ácido acético apto para la producción de vinagres de frutas", es decir que se buscan bacterias que transformen rápidamente el etanol presente en un mosto, en ácido acético, por lo tanto las bacterias que podrían ser útiles serán aquellas que posean ésta característica. De todas las bacterias aisladas, sólo se podrían utilizar las identificadas como: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*, ya que *Asaia* y *Saccharibacter* no pueden oxidar el etanol a ácido acético. Con respecto al género *Acidomonas*, si bien podrían transformar el etanol en ácido acético, en la bibliografía no se reporta su uso en la elaboración de vinagres.

En la Tabla 3.8 se muestra la distribución de BAA aisladas a partir de arándanos y frutas cítricas, de acuerdo al caldo de enriquecimiento utilizado. Por el número de microorganismos recuperados se puede deducir que el caldo

de enriquecimiento **I**, que contiene glucosa, extracto de levadura y etanol tuvo el mejor comportamiento; en efecto es el recomendado para aislar la mayoría de los géneros de BAA (Kerstens et al. 2006; Lisdiyanti et al. 2003). Se aislaron mayoritariamente bacterias del género *Acetobacter*, lo que coincide con lo reportado por Seearunruangchai (2004). Sin embargo, también se aislaron *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Asaia* y *Saccharibacter*, seguramente favorecidas por el abundante contenido de etanol del medio, pues las BAA, están adaptadas a líquidos alcoholizados, de hecho, uno de sus principales hábitats son las bebidas alcohólicas (Jojima et al. 2004; Hurtado et al. 2011). Tanasupawat utilizó este caldo de enriquecimiento para aislar BAA a partir de frutas y flores de Tailandia logrando recuperar bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Asaia* (Tanasupawat et al. 2009).

Tabla 3.8 Géneros aislados de acuerdo al caldo de enriquecimiento.

Géneros	Medios de Enriquecimiento		
	I	II	III
<i>Acidomonas</i>	2	2	1
<i>Asaia</i>	2		5
<i>Acetobacter</i>	8	4	1
<i>Gluconobacter</i>	4	1	
<i>Gluconacetobacter</i>		1	
<i>Saccharibacter</i>	2	3	
Total	18	11	7

El medio de enriquecimiento **II** favoreció el aislamiento de bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas* y *Saccharibacter*. La adición de etanol y ácido acético permite el crecimiento de la mayoría de las BAA, excepto el género *Asaia*, ya que éste es inhibido por el ácido acético (Lisdiyanti et al. 2003; Kerstens et al. 2006). Los resultados encontrados en esta investigación coinciden con lo informado por dichos autores, ya que del enriquecimiento en este caldo no se aislaron bacterias del género *Asaia*. Sin embargo, algunos investigadores reportaron lo contrario, es decir aislamientos de bacterias del género *Asaia* a partir de este caldo de enriquecimiento. Malimas et al. (2008a) y Yukphan et al. (2004a) las aislaron a

partir de flores autóctonas de Tailandia y Kommanee et al. (2010) a partir de flores de tulipán africano. Por otro lado, Yamada et al. (1999), buscando BAA en flores y frutas de Indonesia obtuvo 64 aislamientos, partiendo de este medio, identificados posteriormente como pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* y Iino et al. (2012a) logró aislar *Acetobacter* usando este medio de enriquecimiento.

La recuperación de BAA en el medio **III** fue escasa, posiblemente debido a que es un caldo de enriquecimiento adecuado para el posterior aislamiento de bacterias acéticas a partir de alimentos fermentados y no de fruta fresca (Moonmangmee et al. 2003), lo que coincide con lo reportado por otros autores que han aislado distintas especies de *Acetobacter* a partir de productos fermentados, tales como vino de arroz, vino de palma y tofú (Lisdiyanti et al. 2001). Este medio permitió el ulterior aislamiento de BAA principalmente, del género *Asaia*, además de *Acetobacter* y *Acidomonas*. La presencia de D-manitol en el medio pudo haber favorecido el desarrollo de *Asaia*, ya que es una buena fuente de carbono para los miembros de éste género (Yamada et al. 2000; Katsura et al. 2001).

Ciertas características fenotípicas pueden contribuir a la diferenciación genérica de la familia *Acetobacteraceae*. Los géneros *Neoasaia*, *Tanticharoenia*, *Gluconobacter* y los publicados recientemente, *Swingsia* (Malimas et al. 2013), *Neokomagataea* (Yukphan et al. 2011) no oxidan el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O, estos dos últimos se distinguen de los primeros ya que no pueden crecer en 0,35% (v/v) de ácido acético, *Gluconobacter* se caracteriza por producir ácidos a partir del D-manitol y el D-sorbitol, en cambio *Neoasaia* y *Tanticharoenia* no lo hacen (Malimas et al. 2013). *Acidomonas* y *Nguyenibacter* oxidan el acetato a CO₂ y H₂O pero no el lactato, para separarlas se usa la prueba de crecimiento en metanol como fuente de C, ya que sólo *Acidomonas* lo puede realizar (Yamashita et al. 2004), además *Nguyenibacter* no produce ácido acético a partir de etanol (Vu et al. 2013). *Gluconacetobacter* y *Acetobacter* oxidan el acetato y el lactato a CO₂ y

H₂O y poseen ubiquinona Q10 y ubiquinona Q9, respectivamente (González 2005; Kersters et al. 2006; Yukphan et al. 2005, 2011; Malimas et al. 2013; Vu et al. 2013). En investigaciones recientes, Yamada et al. (2012a, 2012b) propuso la subdivisión en base a ciertas pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, a la secuenciación del 16S ARNr y posterior análisis del árbol filogenético, del género *Gluconacetobacter* en un nuevo género, *Komagataeibacter*. Entre las diferencias encontradas se encuentran la presencia de flagelos peritricos que permite la movilidad en *Gluconacetobacter*, mientras que *Komagataeibacter* es inmóvil, la formación de pigmentos marrones en agar con glucosa, extracto de levadura y CaCO₃, y la producción de 2-5 cetogluconato a partir de glucosa son características que están presente sólo en el género *Gluconacetobacter*. Finalmente, las posiciones taxonómicas fueron confirmados filogenéticamente, mediante la construcción de un árbol filogenético basado en la secuenciación del 16S rARN. Los géneros *Asaia*, *Kozakia* y *Swaminathania* presentan algunas características comunes, oxidan débilmente el acetato y el lactato, crecen en presencia de manitol, presentan ubiquinona Q10; sin embargo, se diferencian, *Asaia* es el único que no produce ácido acético a partir de etanol y su crecimiento es inhibido por 0,35% (v/v) de ácido acético y *Kozakia* y *Swaminathania* se diferencian entre sí, ya que la primera no se desarrolla en agar glutamato y en KNO₃ al 1%, en cambio, *Swaminathania* si lo puede hacer (Loganathan y Nair 2004; Malimas et al. 2013), además, fija el nitrógeno y solubiliza el PO₄⁻³ en presencia de NaCl (Loganathan y Nair 2004). El género *Saccharibacter* presenta una débil producción de ácido acético a partir de etanol, tiene propiedades de crecimiento osmofílico y puede oxidar débilmente el lactato, pero no el acetato (Malimas et al. 2013). El género *Granulibacter* oxida el lactato y débilmente el acetato (Greenberg et al. 2006), en cambio, *Ameyamaea* oxida el acetato y débilmente el lactato (Yukphan et al. 2009).

3.4 CONCLUSIONES

Las frutas de la región de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina) fueron un nicho destacado para el aislamiento de bacterias, pues se aislaron 36 BAA a partir de arándanos y frutas cítricas. En los caldos de enriquecimiento **I** y **II** se recuperaron el mayor número de BAA, probablemente debido a la presencia de etanol y/o ácido acético que favorecen el crecimiento de las mismas.

En el jugo fermentado de las frutas cítricas se obtuvo un mayor número de BAA respecto del jugo fresco o la cáscara, debido a que la fermentación del mismo provocó un aumento en la concentración de etanol, y éste actuó como agente de selección para microorganismos resistentes al mismo.

Las pruebas bioquímicas realizadas permitieron diferenciar las bacterias a nivel de géneros. Se pudieron reconocer 6 géneros: 13 aislamientos fueron identificados como *Acetobacter*, 5 como *Gluconobacter*, 7 como *Asaia*, 5 como *Acidomonas*, 1 como *Gluconacetobacter* y 5 como *Saccharibacter*.

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación, podemos concluir que las cepas de *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* aisladas de arándanos y de frutas cítricas, podrían ser utilizadas para el desarrollo de un cultivo starter apto para la biooxidación, de mostos alcohólicos obtenidos a partir de los excedentes de estos frutos, y obtener vinagres de frutas con características particulares.

3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asai, T., Iizuka, H. y Komagata, K. (1964). The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of

- intermediae strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *10*(2), 95–126.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I. M., Cantero-Moreno, D., Barja, F. y García-García, I. (2006). Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry*, *41*(5), 1160–1164.
- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H. y Henschke, P. a. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *36*(5), 307–314.
- Beheshti Maal, K. (2014). Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. *Advances in Environmental Biology*, *8*(10), 1063–1071.
- Beheshti Maal, K. y Shafiee, R. (2010). Characterization of an *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach that tolerates high temperatures and ethanol concentrations. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, *38*(2), 131–135.
- Beheshti Maal, K. y Shafiee, R. (2011). A Thermotolerant *Acetobacter* Strain Isolated from Iranian Peach Suitable for Industrial Microbiology. *Asian Journal of Biological Sciences*, *4*(3), 244–251.
- Blasco, L., Ferrer, S. y Pardo, I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *225*, 115–123.
- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M. y Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *21*(2), 220–9.
- Carr, J. G. y Shimwell, J. L. (1961). The Acetic Acid Bacteria, 1941-1961. A critical Review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *27*(1), 386-400.
- Castro, C., Cleenwerck, I., Trcek, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J. y Gañán, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp.

- nov., cellulose and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 1119-25.
- Chen, T., Gui, Q., Shi, J. J., Zhang, X. Y. y Chen, F. S. (2013). Analysis of variation of main components during aging process of Shanxi Aged Vinegar. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1), 31–38.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1647–52.
- Cleenwerck, I. y De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2–14.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. y Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1551–1558.
- De Ley, J. y Frateur, J. (1974). Genus *Acetobacter* Beijerinck 1898. In E. B. y N. E. G. B. W. y Wilkins. (Ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th edn, pp. 276–278).
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S. y Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, 23(8), 809–813.
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: A Review. *American Journal Enology and Viticulture*, 39, 143–154.

- Du Toit, W. J. y Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.
- Du Toit, W. J. y Pretorius, I. S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52, 155–179.
- Dutta, D. y Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1899–903.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H. y Suzuki, K. I. (1985). *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31, 475–490.
- Forbes, P., Mangas Ramis, E. y Pagano, N. (2009). Diseño y Evaluación de Proyectos Agroindustriales - Producción de Arándanos. [Consulta: 29 julio 2015]. Disponible en: <http://www.agro.unlpam.edu.ar/licenciatura/disenoproducciondearandanos.pdf>
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., Wang, E., Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellano, J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1305–1314.
- Gamazo, C., Lopez-Goñi, I. y Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología* (3º Edición). Barcelona, España: Elsevier Masson.
- García-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L. y Cornelis, P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean

- fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2281–92.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M. y Stephan, M. P. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 361–364.
- González, A., Guillamón, J. M., Mas, A., y Poblet, M. (2006). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 141–6.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 295–304.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. y Guillamon, J. M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 853–860.
- González, Á. (2005). *Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Holland, S. y Zelazny, A. M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(11), 2609–16.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–12.

- Gullo, M., De Vero, L. y Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2585–9.
- Gullo, M. y Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 46–53.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N. y Kumar, A. (2001). *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications. *International Journal of Food Microbiology*, 3(3), 445–456.
- Hanklin, L. y Lacy, G. (1992). Pectinolytic microorganisms. In C. Vanderzant y D. F. (Eds) Splittstoesser (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (176–183). American Public Health Assoc., Washington DC.
- Harrigan, W. F. y Mc. Cance, M. E. (1979). *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. Editorial Academia, León, España.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A y Torija, M. J. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiology*, 30(1), 98–104.
- Hurtado, M. A., Ramos, I. M., Parrado, D. S. y Guzmán, H. E. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias ácido acéticas en materia prima y tren de fermentación en el Ingenio Providencia S.A. *Revista Técnicaña*, 27, 4–10.
- Ibarra-Sanchez, L., Alvarado-Casillas, S., Rodríguez-García, M., Martínez-Gonzales, N. y Castillo, A. (2004). Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection*, 67, 1353–1358.
- Iino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. y Uchimura, T. (2012a). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov.,

- and *Acetobacter persicus* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 235–243.
- Iino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. y Uchimura, T. (2012b). *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1465–9.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J. y Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 245–9.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M. y Sait, M. (2002). Improved cultur- ability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2391–2396.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S. y Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2263–7.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau Gayón, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria Turing fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 153–156.
- Kalia, A. y Gupta, R. (2006). Fruit microbiology. In Y. H. (Eds) Hui (Ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (3–28). Iowa, Blackwell Publishing.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Yakushi, T., Toyama, H., Adachi, O. y Matsushita, K. (2010). Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 741–51.

- Kappeng, K. y Pathom-aree, W. (2009). Isolation of acetic acid bacteria from honey. *Journal of Science and Technology*, 3(01), 71–76.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 559–563.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. y Swings, J. (2006). The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes*, 5, 163–200.
- Komagata, K., Iino, T. y Yamada, Y. (2014). The Family *Acetobacteraceae*. In E. R. et al. (Ed.), *The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (545–577). Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2010). *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 81–87.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2003). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 91–99.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(3), 147–165.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian

- sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(3), 119–131.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y. y Uchimura, T. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Food Science y Technology*, 52, 813–818.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T. y Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2101–11.
- Loganathan, P. y Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1185–90.
- Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Vu, H., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Tanasupawat, S., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2013). *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 375–384.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2008a). *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 666–71.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. y Tanticharoen, M. (2008b). *Gluconobacter roseus* (ex Asai 1935) sp. nov., nom. rev., a pink-

- colored acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54, 119–125.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2008c). Full Paper *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54, 211–220.
- Mamlouk, D. y Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384.
- Mandigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). *Brock, Biología de Los Microorganismos*. (P. Hall, Ed.) (12^o Edición). Madrid, España.
- Mason, L. M. y Claus, G. W. (1989). Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(2), 174–184.
- Mesa, M. M., Macías, M., Cantero, D. y Barja, F. (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *The Journal of Fluorescence*, 13, 261–265.
- Millet, V. y Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 136-141.
- Moonmangmee, D., Taloadtaisong, Rangsan Saowaro, S., Moonmangmee, S. y Tanasupawat, S. (2003). Vinegar Making From Thai Traditional Alcoholic Beverage, Satoh. In *KMUTT annual research abstracts* (p. 113). Bangkok. Thailand: ISBN 974-456-528-4. [Consulta: 10 septiembre 2014]. Disponible en: WWW.agriqua.doae.go.th/.../P_2_Duangtip.pdf.

- Mossel, D. A., Moreno, B. y Struijk, C. B. (2003). *Microbiología de los Alimentos* (2º Ed). Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S. y Chibata, I. (1979). Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1056–1060.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. y Murooka, Y. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 986–990.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A., Kere, C., Diawara, B. y Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 916–923.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but non culturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, 93-100.
- Palacios, P. (2010). Los pequeños y medianos citricultores de Concordia, Argentina. Dificultades y posibilidades de permanencia. *Revista de Geografía*, 8, 71–89.
- Pao, S., y Davis, C. (2001). Transfer of natural and artificially inoculated microorganisms from orange fruit to fresh juice during extraction. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 34, 113–117.
- Passmore, S. M. y Carr, J. G. (1975). The ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. *Journal of Applied Bacteriology*, 38, 151–158.
- Quintero, Y., González, A., Poblet, M., Guillamon, J. y Mas, M. (2004). Importancia de las bacterias acéticas en el vino. *Enorigen: Revista Profesional de La Actualidad Enológica*, 1, 6–12.

- Raj, B. S., Chandra, M. y Agarwal, R. (2005). Interaction of *Salmonella enterica* Subspecies enterica Serovar Typhimurium and mungbean (*Phaseolus aureus*) plants. *Journal of Food Protection*, 68, 476–481.
- Romero-Cortes, T., Robles-Olera, V., Rodriguez-Jimenes, G. y Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1981–1987.
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I. y Frébortová, J. (2014). Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. Article in Press. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.001
- Schuller, G., Hertel, C. y Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2013–2020.
- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T. y Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50(1), 47–53.
- Sengun, I. Y. y Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656.
- Sievers, M., Sellmer, S. y Teuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 386–392.
- Sievers, M. y Swings, J. (2005). Family *Acetobacteraceae*. In G. M. Garrity (Ed.), *Bergey's Manual of Bacteriology*. New York: Springer-Verlag.

- Slapsak, N., Cleenwerck, I., De Vos, P. y Trček, J. (2013). *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 17–21.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. (1993). Sorbic acid and sorbates. In P. M. Davidson y A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in Foods* (2^o Ed), (pp. 49–94). Nueva York: Marcel Dekker.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998a). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 3195–206.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998b). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 935–940.
- Sokollek, S. J. y Hammes, W. P. (1997). Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 481–491.
- Stabile, C. (2015). Estrategias para diferenciar la industria argentina del arándano. [Consulta: 29 de julio 2015]. Disponible en http://www.apama.com.ar/noticias/122_estrategias-para-diferenciar-la-industria-argentina-del-arandano.html
- Stasiak, L. y Błażej, S. (2009). Acetic acid bacteria – Perspectives of application in biotechnology – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59(1), 17–23.
- Suzuki, R., Zhang, Y., Iino, T., Kosako, Y., Komagata, K. y Uchimura, T. (2010). *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 339–346.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Malimas, T., Yukphan, P., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2009). Identification of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Asaia* strains isolated in Thailand based on 16S-23S rRNA gene internal

- transcribed spacer restriction and 16S rRNA gene sequence analyses. *Microbes and Environments*, 24(2), 135–143.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O. y Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 159–167.
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan – MGB probes. *Food Microbiology*, 27, 257–265.
- Trcek, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S – 23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ- dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 735-745.
- Valera, M. J., Laich, F., González, S. S., Torija, M. J., Mateo, E. y Mas, A. (2011). Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 105–112.
- Vegas, C., González, Á., Mateo, E., Mas, A., Poblet, M. y Torija, M. J. (2013). Evaluation of representativity of the acetic acid bacteria species identified by culture-dependent method during a traditional wine vinegar production. *Food Research International*, 51, 404–411.
- Vera, L. y Díaz Vélez, R. (2013). *Informe de la provincia de Entre Ríos 2013*. I.N.T.A.-E.E.A. Concordia: [Consulta: 29 de julio 2015]. www.fecier.org.ar/descarga.php?id=InformeCitricola-EntreRios2012.pdf.
- Vu, H. T. L, Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Muramatsu, Y., Thi Tu Bui, U., Tanasupawat, S., Duong, K., Nakagawa, Y., Thanh Pham, H. y Yamada, Y. (2013). *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov. sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 153–166.

- Vu, T. L. H., Malimas, T., Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Thanh Loan, L. T., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2007). Identification of Thai isolates assigned to the genus *Gluconobacter* based on 16S-23S rDNA ITS restriction analysis. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *53*, 133–142.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F. y Giudici, P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current Microbiology*, *60*(4), 280–286.
- Wu, J. J., Kun Ma, D. Y., Zhang, F. F. y Chen, F. S. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of Shanxi aged vinegar, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, *30*(1), 289–297.
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* com. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*, 2225–2227.
- Yamada, Y., Aida, K. O. y Uemura, T. (1969). Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of the so-called intermediate. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *15*, 181–196.
- Yamada, Y., Hoshino, K. y Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, *61*(8), 1244-1251
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. y Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus

- Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 23–28.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T. y Uchimura, T. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 823–829.
- Yamada, Y., Okada, Y. y Kondo, K. (1976). Isolation and characterization of “polarly flagellated intermediate strains” in acetic acid bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 22, 237–245.
- Yamada, Y. y Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15-24
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. y Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849–859.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. y Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 397–404.
- Yamashita, S., Uchimura, T. y Komagata, K. (2004). Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami , Tamaoka , Suzuki and Komagata 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 865–870.
- Yoshitaka, A., Toyama, H., Adachi, O. y Matsushita, K. (2008). Energy metabolism of a unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, that lacks ethanol oxidation activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(4), 989–997.

- Yukphan, P., Malimas, T. M., Muramatsu, Y. M., Takahashi, M. T., Kaneyasu, M. K., Tanasupawat, S. T., Nakagawa, Y. N., Potacharoen, W. P. y Yamada, Y. (2008). *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a New Osmotolerant Acetic Acid Bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 672–676.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2011). *Neokomagataea* gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., Osmotolerant Acetic Acid Bacteria of the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(3), 419–426.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2005). *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 301–311.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2004a). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 313–316.
- Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2004b). Re-identification of *Gluconobacter* strains based on restriction analysis of 16S – 23S rDNA internal transcribed spacer regions. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 189–195.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Hamana, K., Tahara, Y., Suzuki, K. y Yamada, Y. (2009). *Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an Acetic Acid Bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(10), 2156–2162.

Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia.

CAPÍTULO N° 4

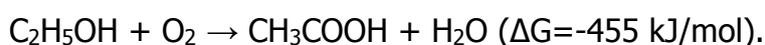
***ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE
ACETIFICACIÓN***

4.1 INTRODUCCIÓN

El uso de cultivos iniciadores es una práctica común para la producción de alimentos fermentados, en particular para la elaboración de vino, productos lácteos y embutidos, ya que permite controlar el proceso y obtener productos finales con alta calidad y reproductibilidad (Gullo y Giudici 2008; Gullo et al. 2009; Hidalgo et al. 2013). Sin embargo, el vinagre es una bebida fermentada producida en pequeña y gran escala, sin inoculación con cultivos seleccionados. Por el contrario, se ha hecho tradicionalmente, mediante la utilización de la "madre de vinagre", un cultivo mixto, que no está determinado cualitativa, ni cuantitativamente, este método no asegura el control del proceso o la calidad del producto final. Se han realizado algunos estudios donde se propone el uso de cultivos puros de BAA para llevar a cabo el proceso de acetificación (Saeki et al. 1997; Sokollek y Hammes 1997; Gullo et al. 2009; Hidalgo et al. 2010; Hidalgo et al. 2013; Wang et al. 2013). Los citados estudios demuestran interés en la práctica de la inoculación en el proceso de acetificación, para evitar contaminaciones microbianas, ayudar a completar el proceso, obtener altos rendimientos y productos con alta calidad y reproducibilidad. Por lo tanto, la selección de las cepas más adecuadas para llevar a cabo esta transformación puede ser una buena estrategia para la mejora de la producción de vinagre.

La selección de cultivos iniciadores permite elegir las cepas más capaces de liderar el proceso de acetificación para lograr productos en el menor tiempo posible, con alta reproducibilidad y de buena calidad, manteniendo las características naturales de la materia prima que se desean en el vinagre.

La reacción de acetificación es un proceso aeróbico de oxidación biológica en el cual las BAA transforman el etanol en ácido acético, la reacción se puede representar por la siguiente ecuación:



donde el etanol puede ser el que está presente en líquidos tales como licores, vino o sidra o se lo puede obtener a través de fermentaciones controladas con

Saccharomyces cerevisiae a partir de jugos de frutas (Ameyapoh et al. 2010; Hidalgo et al. 2013; Sossou et al. 2009).

Dentro de los géneros de BAA, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* son los más utilizados para la fermentación acética debido a su habilidad para oxidar el etanol y su tolerancia a las altas concentraciones de ácido acético que se acumula en dicho proceso (Gullo et al. 2006). Sin embargo el género *Gluconobacter* ha sido aislado de vinagres elaborados en procesos superficiales (Andrés-Barrao et al. 2013) y particularmente *G. oxydans* subespecie *sphaericus*, ha sido utilizado en la elaboración de vinagres en cultivo sumergido (Saeki, 1993). Ciani (1998) comparó dos vinagres obtenidos con una cepa de *G. oxydans* y *A. aceti* y no encontró diferencias en las características físico-químicas de dichos vinagres. Además, hay que tener en cuenta que algunas especies del género *Gluconacetobacter* han sido re-clasificadas en un nuevo género, *Komagataeibacter*, por lo tanto, éste género se debe incluir dentro de los utilizados para elaborar vinagres. Las especies más frecuentemente utilizadas son *A. pasteurianus*, *A. polyoxogenes*, *Ko. xylinus*, *Ko. hansenii*, *Ko. europaeus*, *Ko. oboediens*, *Ko. intermedius*, *Ga. entanii* (Gullo et al. 2006; Yamada et al. 2012a, 2012b). *A. pasteurianus* se utiliza en procesos tradicionales de obtención de vinagres que no exceden el 6% p/v de ácido acético, en cambio la especie *Ko. europaeus* se utiliza para vinagres con alta producción de ácido acético, hasta 10% p/v (Yamada et al. 2012a; Matsutani et al. 2013).

El proceso de acetificación es una buena alternativa para obtener productos con características organolépticas especiales (Hidalgo et al. 2013) y además, permite utilizar excedentes de frutas que no pueden ser destinadas al consumo en fresco y que de otra manera, serían desechadas, y consecuentemente traerían pérdidas económicas. En los últimos años, el conocimiento y diversidad de las BAA ha sido objeto de un mayor interés y se han realizado estudios ecológicos de las mismas en distintas regiones del mundo, ya sea en vinagres de vino (Ilabaca et al. 2008; Hidalgo et al. 2010,

2013; Vegas et al. 2010, 2013; Mas et al. 2014), en vinagres procedentes de otras materias primas (Tokunaga et al. 2009; Wu et al. 2010; Hidalgo et al. 2013; Nie et al. 2013; Valera et al. 2015), como también, durante transformación del mosto de uva en vino (González et al. 2004; Silva et al. 2006; Barata et al. 2012; Kántor et al. 2013), este último motivado por el interés en realizar procesos controlados, sin contaminantes, como las BAA que originen alteraciones en la calidad del vino.

Actualmente, la producción industrial de vinagre se lleva a cabo normalmente por fermentación sumergida continua a los fines de asegurar una alta velocidad de fermentación, así como un buen rendimiento de ácido acético. Sin embargo, este proceso requiere un control preciso de la temperatura de fermentación. La temperatura óptima del proceso es de aproximadamente 30 °C; un ligero aumento por encima de este valor conduce a una disminución en la velocidad de fermentación y en el rendimiento de ácido acético. Por otra parte, durante el proceso de oxidación se genera una gran cantidad de calor, por lo que para mantener la temperatura adecuada es necesario contar con un buen sistema de refrigeración. Con el fin de reducir el costo de enfriamiento y evitar pérdidas de rendimiento, se han realizado estudios para aislar y caracterizar cepas termotolerantes, con alta resistencia al etanol y al ácido acético (Lu et al. 1999; Ndoye et al. 2006; Kanchanarach et al. 2010; Beheshti Maal y Shafiee 2010, 2011).

Los criterios para la selección de cepas para ser utilizadas en procesos de acetificación se centran principalmente en buscar aquellas resistentes a las temperaturas y a altas concentraciones de sustrato y producto final (Tesfaye et al. 2002). En este trabajo sólo se evaluó la influencia en la velocidad de crecimiento de BAA de dos factores: concentración de etanol y concentración de ácido acético; manteniendo constantes: temperatura (30 °C) y velocidad de agitación (200 rpm).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 BACTERIAS

Los ensayos de acetificación se realizaron sólo con las bacterias que de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas, permitirían obtener un cultivo iniciador con características adecuadas para la elaboración de vinagres de frutas. Es por ello que se eligieron los aislados identificados como *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*, que son los frecuentemente utilizados en la elaboración de este producto (Raspor y Goranovic 2008; Kanchanarach et al. 2010; Sengun y Karabiyikli 2011).

Se utilizaron 16 BAA aisladas de frutas de la región: A50, A140, A210 (identificadas previamente como *Acetobacter*), A70 (*Gluconacetobacter*) y A80, A160, A180 (*Gluconobacter*) aisladas de arándanos y C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C9 (*Acetobacter*) y C7 y C8 (*Gluconobacter*) aisladas de frutas cítricas.

4.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS

PRE-CULTIVO: las BAA conservadas por congelación a -20 °C con 20 % de glicerol, como crioprotector fueron inoculadas en 5 mL de caldo GYC (2% de glucosa, 0,8% extracto de levadura, 0,5% de peptona y 0,5% de etanol). Se incubaron en estufa Faeta (Argentina) durante 72 horas a 30±1 °C.

Posteriormente, los 5 mL del precultivo se transfirieron a 100 mL de caldo RAE (2% glucosa, 0,8% extracto de levadura, 0,5% peptona). Con el fin de estudiar la sensibilidad de los cultivos frente al AA y al E, se ensayaron dos concentraciones de ácido acético (AA) (0,5%, 1,0% p/v) y tres concentraciones de etanol (E) (4, 6, 8% v/v). Se incubaron a 30±1 °C durante 72 horas, en agitador orbital JP SELECTA modelo Rotabit, (España) a 200 rpm. El seguimiento de la acetificación se hizo a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas y se realizó con los siguientes parámetros: acidez total, recuento celular y densidad óptica (DO). Los ensayos se hicieron por duplicado.

4.2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.2.3.1 ACIDEZ TOTAL por titulación potenciométrica (AOAC 15TH 942.15 B, 1990), expresando el resultado como g/L de AA.

4.2.3.2 RECUENTO CELULAR (RC) en microscopio óptico Leica DME (Estados Unidos), con cámara de Petroff-Hauser de volumen igual a 2×10^8 mL, expresando el resultado como células/mL.

4.2.3.3 DENSIDAD ÓPTICA (DO): la evolución de la biomasa fue testada mediante método turbidimétrico, utilizando la densidad óptica a 540nm, ($DO_{\lambda=540}$) en espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1603 (Japón).

4.2.4 VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN

Para evaluar la velocidad de acetificación se tomaron los resultados de acidez titulable, medidos cada 24 horas y expresados como g/L de AA. Para el cálculo se usó con la fórmula $(VA) = (C_{Af} - C_{Ai}) / (t_f - t_i)$, donde C_{Ai} y C_{Af} son las concentraciones de AA (g AA/L) inicial y final para los tiempos t_i y t_f , respectivamente (Nieto, 1991; Tesfaye et al. 2000).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE BAA

Se estudiaron los efectos de la concentración de E y de AA en el crecimiento de 16 BAA aisladas a partir de arándanos y frutas cítricas en caldo RAE. Las gráficas que describen la cinética de crecimiento de las mismas (DO en función del tiempo) se representan en las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3.

El estudio se realizó en shaker a 200 rpm (Kanchanarach et al. 2010; Sokollek et al. 1998; Sokollek y Hammes, 1997) durante 3 días (Lu et al. 1999) a 30 ± 1 °C (Sokollek y Hammes, 1997; Sokollek et al. 1998; Lu et al. 1999; Kanchanarach et al. 2010). Las condiciones utilizadas para la preparación de inóculos para la elaboración de vinagres son muy variables. Así por ejemplo, Lu et al. utilizó 150 rpm durante 3 días a 30 °C (1999), Sharafi et al. (2010) realizaron sus estudios en dos condiciones de agitación (180 y 210 rpm), a tres temperaturas (25, 31, 37 °C) y sólo con 12 horas de incubación. En cuanto a la temperatura de incubación, las BAA son mesófilas, sin embargo muchos autores han reportado estudios a 37 °C y 40 °C (Ndoye et al. 2007; Beheshti Maal y Shafiee 2010, 2011; Beheshti Maal 2014), inclusive a temperatura superiores (Ndoye et al. 2006; Kanchanarach et al. 2010; Matsutani et al. 2013), pues su búsqueda estuvo orientada a bacterias termotolerantes, (la elaboración de vinagre es un proceso muy exotérmico), capaces de crecer y producir AA en esas condiciones.

Cuando se inoculan microorganismos en un medio cultivo fresco, lo esperado, es una fase de adaptación durante la cual se sintetizan las enzimas requeridas para la degradación del sustrato (Mandigan et al. 2009). En las curvas de crecimiento de las Figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4, se observa que, algunos aislados presentaron una fase de latencia bien diferenciada, de 24 horas. Sin embargo, en coincidencia con lo encontrado por Kanchanarach et al. (2010) en su estudio de caracterización de *A. pasterurianus*, la mayoría de los aislados presentaron una mayor pendiente en esta etapa, debido a un pronunciado aumento de la DO durante las primeras 24 horas, por lo que se puede inferir que no hubo fase de latencia, probablemente porque éstos se adaptaron rápidamente a las nuevas condiciones de cultivo. Este comportamiento se observó principalmente cuando se trabajó con 4% E y en las dos concentraciones de AA: 0,5% y 1,0%, respectivamente. En el aislado A180 (Figura 4.2) la fase de latencia se extendió por 48 horas cuando la concentración de E fue del 4% y para las dos concentraciones de AA, pasado este tiempo se observó un rápido aumento de la DO.

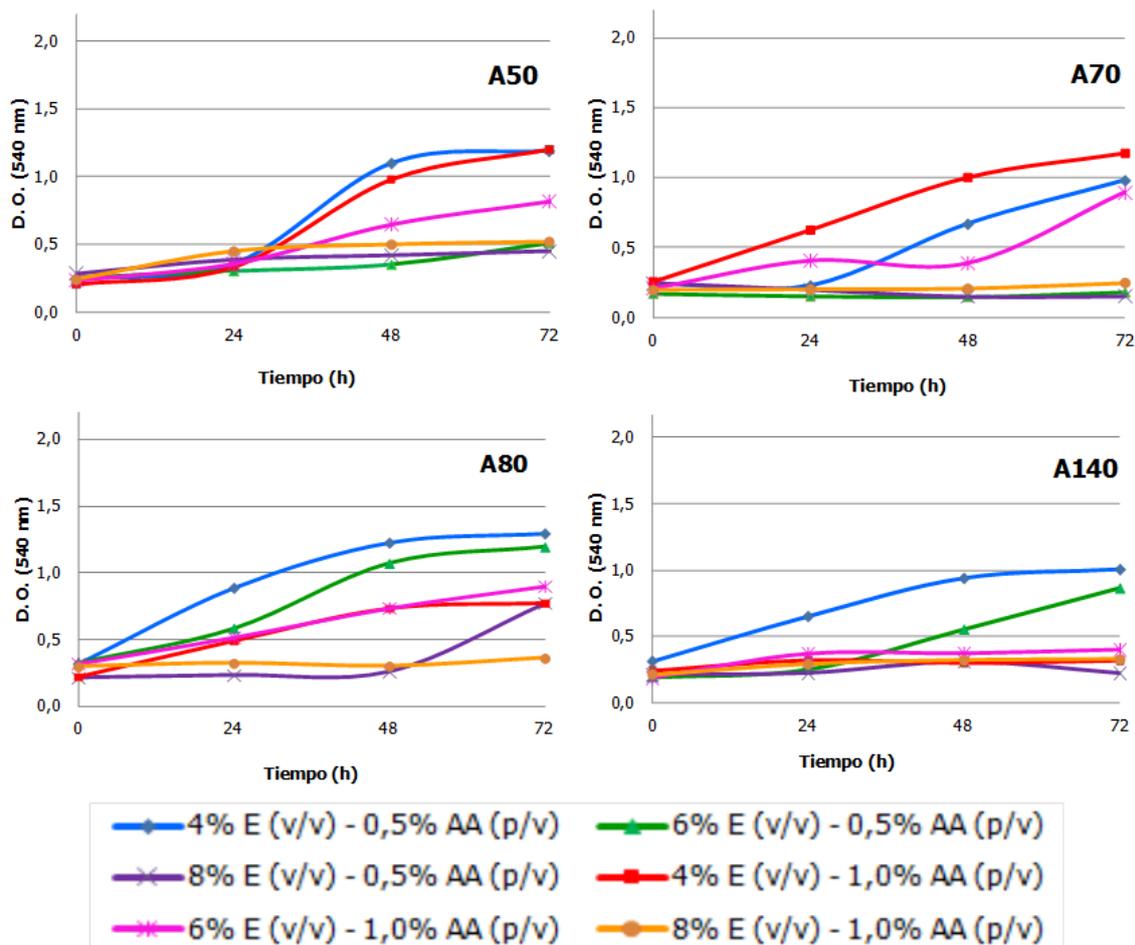


Figura 4.1 Curvas de crecimiento de los aislados A50, A70, A80 y A140, en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

Finalizada la fase de latencia, las BAA ya adaptadas al nuevo medio de cultivo, se reprodujeron exponencialmente, transformando el E en AA. Sin embargo, en 8% de E, la mayoría de los aislados (A50, A70, A140 (Figura 4.1), A160, A 180, A210 (Figura 4.2), C6, C7, C8 y C9) (Figura 4.4) no crecieron y además, no produjeron AA, es decir que tuvieron una fase de latencia más larga, que permaneció durante el tiempo de estudio (72 horas), esto puede deberse a que concentraciones altas de E retrasan el crecimiento de estas

bacterias, pues aumenta su acción inhibitoria (De Ory et al. 2002). Estos resultados coinciden con los encontrados por Beheshti Maal y Shafiei (2011), quienes demostraron que a medida que se incrementa la concentración de E se alarga la fase de latencia, observando que a concentraciones de 8% v/v de E se necesitan 72 horas para ver desarrollo en placas con medio sólido.

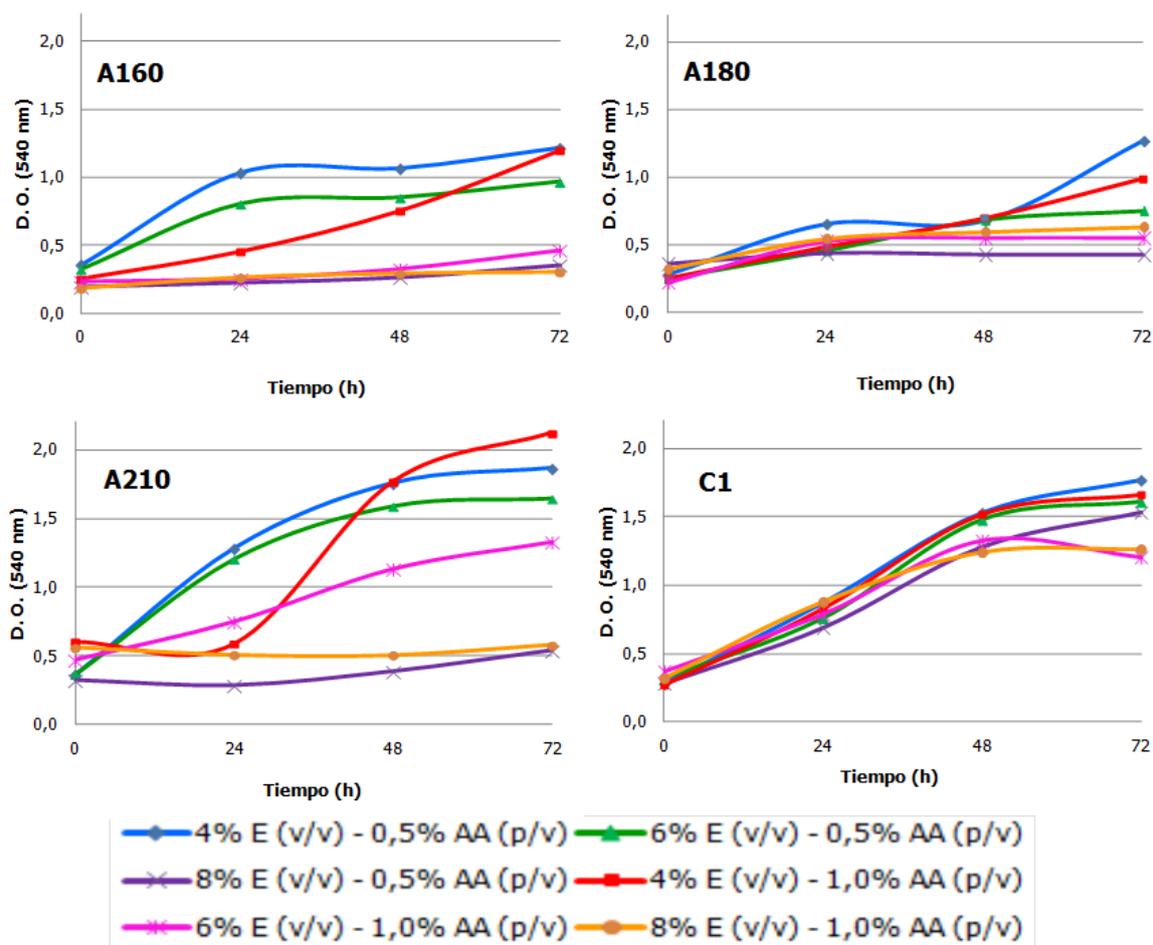


Figura 4.2 Curva de crecimiento de los aislados A160, A180, A210 y C1 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

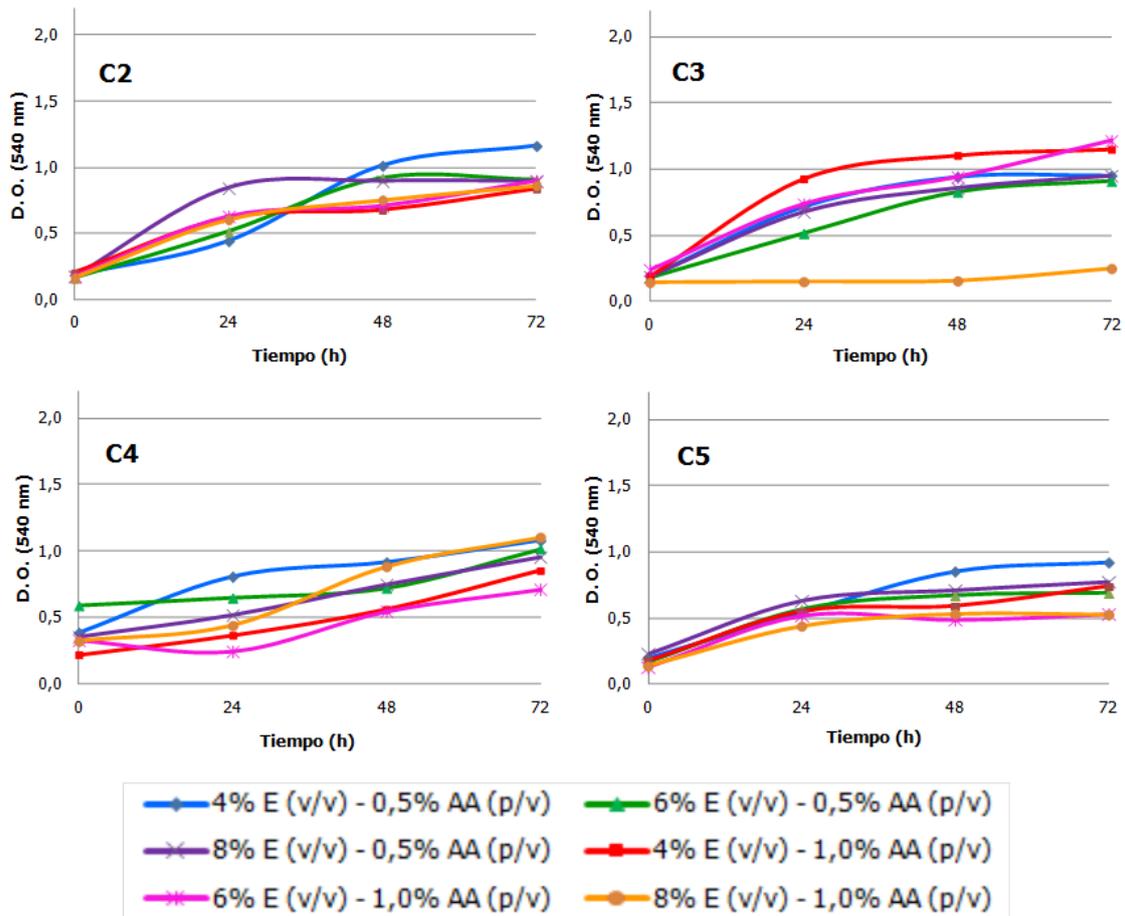


Figura 4.3 Curva de crecimiento de los aislados C2, C3, C4 y C5 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

Las condiciones del inóculo es un parámetro importante para una óptima fermentación acética. De Ory recomienda que el cultivo de BAA debe estar en fase de crecimiento exponencial y con una concentración de biomasa total del orden de 5×10^8 células/mL, en el momento de agregarlo al mosto alcohólico con el que se desea obtener vinagre (De Ory et al. 2004). Sin embargo, SoKollek y Hammes (1997) sugieren recuentos celulares mayores a 10^9 células/mL para tener una fase de latencia corta y de esta manera disminuir tiempos de proceso y por lo tanto, bajar costos de producción.

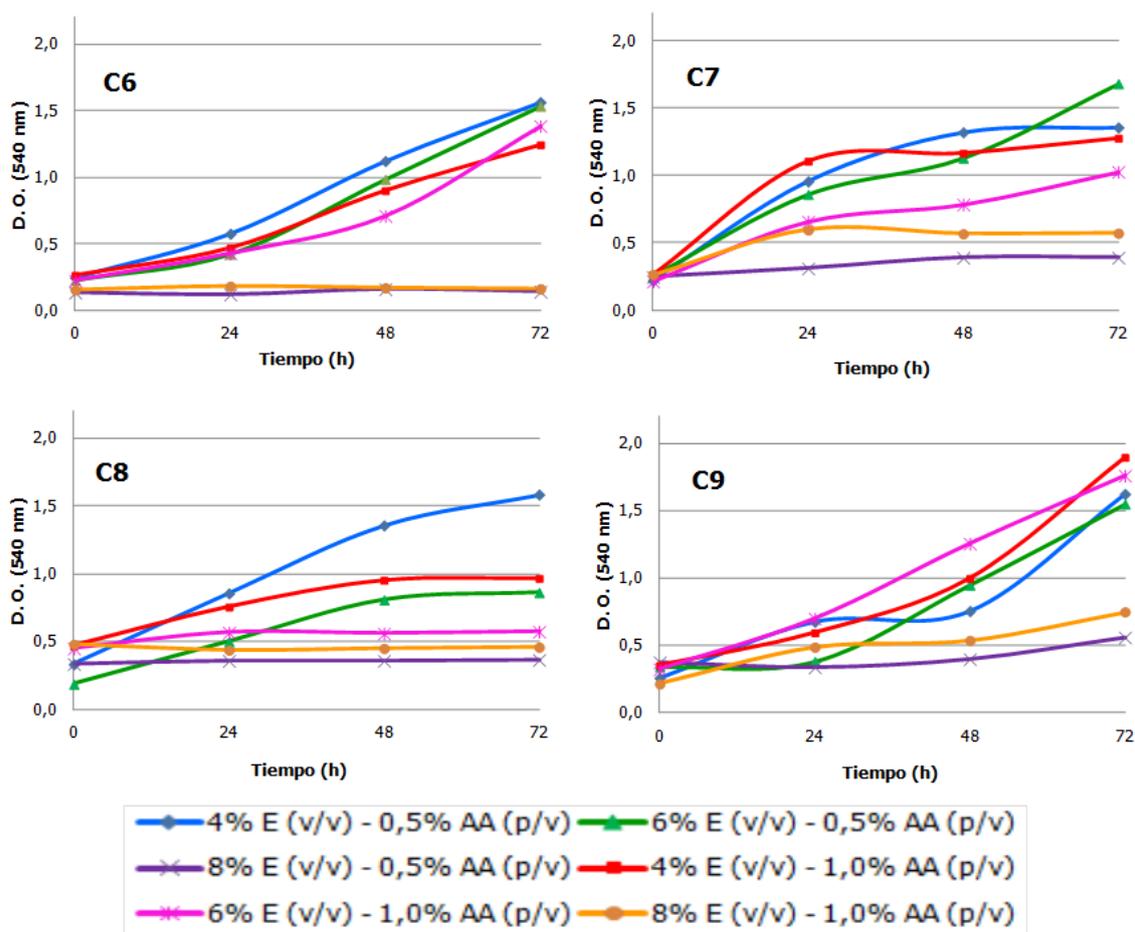


Figura 4.4 Curva de crecimiento de los aislados C6, C7, C8 y C9 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

En la Tabla 4.1, se observan los recuentos iniciales y finales para las BAA en los distintos tratamientos. Teniendo en cuenta las recomendaciones de De Ory, todos los aislados se podrían utilizar como inóculo, ya que al menos en alguna de las condiciones ensayadas se logró alcanzar dicho valor. Sin embargo, si bien las bacterias crecieron y se obtuvieron altos recuentos, también es importante considerar si este aumento en el número de bacterias se corresponde con un aumento en la concentración de AA, ya que para la elaboración de vinagres se buscan, además de altos recuentos, bacterias con capacidad de producir considerables cantidades de AA, para tener altos rendimientos de producción.

Tabla 4.1 Velocidad de acetificación y recuento celular

	0,5 % AA (p/v)				1 % AA (p/v)						
	I	F	I	F	I	F	I	F			
A50	RC 0,5 E + 08 VA 0,31	6,9 E + 08	0,33 E + 08 0,07	1,4 E + 08	0,45 E + 08 0,03	0,6 E + 08	0,52 E + 08 0,40	3,67 E + 08	0,55 E + 08 0,13	1,6 E + 08	0,85 E + 08 0,12
A70	RC 0,34 E + 08 VA 0,25	1,1 E + 08	0,42 E + 08 0,04	0,51 E + 08	0,39 E + 08 0,01	0,50 E + 08	0,83 E + 08 0,23	2,91 E + 08	0,85 E + 08 0,19	2,50 E + 08	0,35 E + 08 0,01
A80	RC 0,56 E + 08 VA 0,52	11,6 E + 08	0,46 E + 08 0,42	4,75 E + 08	0,49 E + 08 0,06	0,81 E + 08	0,61 E + 08 0,41	3,92 E + 08	0,56 E + 08 0,40	5,63 E + 08	0,26 E + 08 0,01
A140	RC 0,76 E + 08 VA 0,28	3,64 E + 08	0,68 E + 08 0,25	2,77 E + 08	0,50 E + 08 0,02	0,61 E + 08	0,43 E + 08 0,15	1,46 E + 08	0,46 E + 08 0,05	0,96 E + 08	0,37 E + 08 0,03
A160	RC 0,12 E + 08 VA 0,36	4,23 E + 08	0,51 E + 08 0,22	5,15 E + 08	0,38 E + 08 0,03	0,82 E + 08	0,18 E + 08 0,49	4,15 E + 08	0,56 E + 08 0,06	5,63 E + 08	0,49 E + 08 0,01
A180	RC 0,42 E + 08 VA 0,26	2,01 E + 08	0,26 E + 08 0,14	3,8 E + 08	0,31 E + 08 0,01	0,79 E + 08	0,33 E + 08 0,26	2,15 E + 08	0,28 E + 08 0,01	1,07 E + 08	0,62 E + 08 0,01
A210	RC 1,05 E + 08 VA 0,57	9,95 E + 08	0,84 E + 08 0,51	7,11 E + 08	0,79 E + 08 0,07	1,2 E + 08	1,10 E + 08 0,59	6,07 E + 08	1,20 E + 08 0,52	6,75 E + 08	0,95 E + 08 0,03

Velocidad de acetificación en caldo RAE a 30±1 °C a 200 rpm durante 72 horas. C: Bacterias aisladas de frutas cítricas,

A: Bacterias aisladas de arándanos, I: inicial, F: final, RC células/ mL, VA g AA/L/h

Tabla 4.1 (Continuación) Velocidad de acetificación y recuento celular

	4 (% v/v)		0,5 % AA (p/v)		8 (% v/v)		1 % AA (p/v)		6 (% v/v)		8 (% v/v)		
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	
C1	RC	0,60 E + 08	6,07 E + 08	0,62 E + 08	6,29 E + 08	0,56 E + 08	2,08 E + 08	0,5 E + 08	6,10 E + 08	0,72 E + 08	3,29 E + 08	0,66 E + 08	2,21 E + 08
	VA	0,52		0,57		0,36		0,60		0,49		0,38	
C2	RC	0,67 E + 08	13,5 E + 08	0,66 E + 08	2,66 E + 08	0,33 E + 08	2,73 E + 08	0,26 E + 08	2,68 E + 08	0,14 E + 08	2,92 E + 08	0,36 E + 08	2,54 E + 08
	VA	0,26		0,28		0,25		0,38		0,37		0,26	
C3	RC	0,86 E + 08	15,1 E + 08	0,73 E + 08	3,73 E + 08	0,44 E + 08	2,80 E + 08	0,59 E + 08	4,92 E + 08	0,86 E + 08	5,60 E + 08	0,27 E + 08	0,50 E + 08
	VA	0,24		0,24		0,26		0,39		0,41		0,06	
C4	RC	1,31 E + 08	8,58 E + 08	1,57 E + 08	10 E + 08	0,85 E + 08	6,4 E + 08	0,56 E + 08	1,52 E + 08	1,20 E + 08	4,62 E + 08	1,10 E + 08	5,40 E + 08
	VA	0,36		0,22		0,31		0,34		0,28		0,26	
C5	RC	0,76 E + 08	17,5 E + 08	0,47 E + 08	2,66 E + 08	0,34 E + 08	1,9 E + 08	0,16 E + 08	2,12 E + 08	0,31 E + 08	1,49 E + 08	0,17 E + 08	1,35 E + 08
	VA	0,36		0,30		0,30		0,36		0,35		0,25	
C6	RC	0,39 E + 08	4,15 E + 08	0,67 E + 08	4,85 E + 08	0,16 E + 08	1,10 E + 08	0,87 E + 08	3,18 E + 08	1,44 E + 08	5,45 E + 08	0,53 E + 08	1,20 E + 08
	VA	0,55		0,55		0,03		0,49		0,48		0,03	
C7	RC	0,84 E + 08	6,06 E + 08	0,47 E + 08	6,21 E + 08	0,66 E + 08	1,20 E + 08	0,81 E + 08	4,48 E + 08	0,73 E + 08	4,83 + E 08	0,65 E + 08	2,12 E + 08
	VA	0,35		0,36		0,03		0,20		0,12		0,02	
C8	RC	0,94 E + 08	5,86 E + 08	0,7 E + 08	2,16 E + 08	0,48 E + 08	0,85 E + 08	2,07 E + 08	4,56 E + 08	0,73 E + 08	1,10 E + 08	0,84 E + 08	1,56 E + 08
	VA	0,35		0,37		0,02		0,20		0,02		0,01	
C9	RC	1,31 E + 08	3,99 E + 08	1,65 E + 08	6,50 E + 08	0,74 E + 08	1,35 E + 08	1,04 E + 08	3,16 E + 08	0,86 E + 08	6,20 E + 08	0,47 E + 08	2,07 E + 08
	VA	0,59		0,39		0,02		0,58		0,54		0,1	

Velocidad de acetificación en caldo RAE a 30±1 °C a 200 rpm durante 72 horas. C: Bacterias aisladas de frutas cítricas, A: Bacterias aisladas de arándanos, I: inicial, F: final, RC células/ mL, VA g AA/L/h

Como se observa en la Tabla 4.1, los recuentos celulares más altos se obtuvieron para 4% de E y 0,5% de AA y para los aislados A80, A210, C2, C3 y C5, alcanzando valores entre 10×10^8 y 18×10^8 células/mL, valores muy superiores a los mencionados por De Ory et al. (2004). Cuando el E fue de 6% y 0,5% de AA se obtuvieron para algunos aislados recuentos aceptables, sin embargo no fueron tan altos como los anteriormente mencionados, y para 8% E y 0,5% AA sólo el aislado C4 logró superar 5×10^8 células/mL. En la Figura 4.5 se observan los porcentajes de bacterias que alcanzaron el mínimo recuento celular estipulado por De Ory para un inóculo destinado a fermentación acética.

Los mayores porcentajes encontrados corresponden a los ensayos realizados con concentraciones de E de 4% y 6% y cuando la concentración de AA fue de 0,5%, demostrando de esta manera, que el crecimiento de las BAA es mayor, cuando la concentración de etanol es baja y en concordancia con lo expresado por De Ory et al. (2002). Estos resultados también confirman los estudios de otros autores, donde informan el efecto tóxico del E por encima del 7% v/v (Yuan et al. 2013) y del 5% (De Ory et al. 2002; Gullo et al. 2006)

La Figura 4.5 muestra que cuando la concentración de AA fue del 1%, el mayor porcentaje de aislados que alcanzó el recuento celular mayor a 5×10^8 células/mL se obtuvo, a diferencia de los resultados alcanzados para 0,5% de AA, cuando la concentración de E fue del 6%, además este porcentaje fue menor que los encontrados para el AA de 0,5% cuando el E fue de 4 y 6%. Es decir, que la menor concentración de AA favoreció el crecimiento de las BAA, lo que coincide con las investigaciones de Nanba, quién encontró que concentraciones más bajas que 1% p/v de AA tienen un efecto activador sobre el crecimiento de las mismas (Nanba et al. 1984).

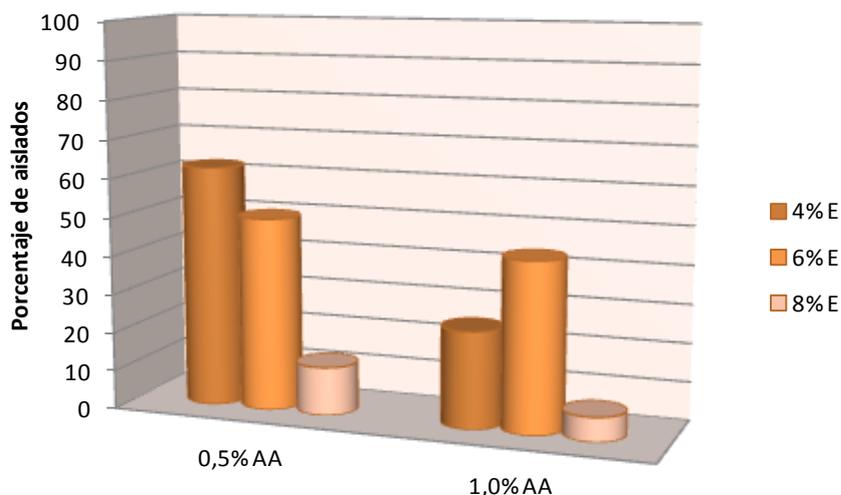


Figura 4.5 Aislados que alcanzaron un recuento mayor a 5×10^8 células/mL

4.3.2 INFLUENCIA DEL ETANOL

La presencia de etanol inhibe el crecimiento y la viabilidad de las células, afectando principalmente la membrana plasmática cambiando la organización y la permeabilidad de la membrana que conduce a la acumulación de solutos y el flujo de protones (Elvir Mairena, 1993; Rivera y Lima, 2013). La tolerancia al etanol es una característica tecnológica deseable para las BAA utilizadas en la elaboración de vinagres (Gullo y Giudici 2008; Yuan et al. 2013).

Se evaluaron tres concentraciones de E (4, 6 y 8% v/v), ya que estas son las que se utilizan habitualmente en la industria del vinagre (Sokollek et al. 1998; Lu et al. 1999; de Ory et al. 2002; De Ory et al. 2004; Gullo et al. 2006; Hidalgo et al. 2013). Las concentraciones más altas no fueron probadas porque la composición de los mostos con los que se realiza el vinagre industrial rara vez suele superar el 10% de alcohol (Gullo et al. 2006; Sossou et al. 2009). Para elegir dichas concentraciones, se tuvieron en cuenta los estudios de Gullo et al. (2006), donde evaluaron el desarrollo de las BAA en distintas concentraciones de E, encontrando que la mayoría crecieron cuando el E fue de

5% v/v y sólo algunas pocas cuando la concentración de E fue del 10% y estudios de Sossou (2009), quienes examinaron el crecimiento de BAA aisladas de ananás, en distintas concentraciones de E (2-14%), hallando que la mayoría de las bacterias pueden crecer cuando la concentración de E varía entre 2 y 6% v/v.

La gran mayoría de las BAA estudiadas, crecieron y toleraron concentraciones de E hasta 6%, sin embargo no todas toleraron concentraciones de 8%. Como ya se ha discutido en el apartado 4.3.1, las altas concentraciones de etanol pueden inducir a un fenómeno de retraso o inhibición por sustrato al inicio de la fermentación acética, lo que provoca un alargamiento de la fase de latencia y una fase de crecimiento más tardía por parte de las BAA (Soo Park et al. 1989).

Los aislados BC1, BC2, BC4 y BC5 fueron los únicos que lograron crecer y producir AA en todas las concentraciones de E y de AA ensayadas, lo que se vio reflejado en el aumento de la DO y en el recuento final de células (Tabla 4.1 y Figuras 4.2 y 4.3), observándose los más altos valores para el aislado C1 cuando la concentración de etanol fue de 4% v/v y para las dos concentraciones de AA estudiadas, la DO llegó hasta 1,77 y 1,66 y el recuento de células hasta $6,07 \times 10^8$ células/mL y $6,1 \times 10^8$ células/mL para 0,5% y 1% p/v de AA respectivamente. Los resultados obtenidos a partir del crecimiento de estos aislados en las distintas condiciones, sugieren que los mismos se adaptaron a las altas concentraciones de E, mientras que los otros aislados no tuvieron la habilidad para tolerar esas concentraciones. Resultados similares se encontraron al realizar pruebas de tolerancia al E (5 y 10% v/v) a 30 °C, en BAA aisladas de un vinagre balsámico industrial caracterizadas como *A. pasteurianus* y *Ga. xilinus*, encontrando que la mayoría de las cepas aisladas fue capaz de crecer a 5% v/v de E, y sólo algunas de ellas en 10% de E (Gullo et al. 2006).

Algunos de los aislados identificados como *Gluconobacter* A80 y C7 (capítulo 3 de esta tesis), contrariamente a lo esperado, han presentado una

tolerancia al E similar a las bacterias identificadas como *Acetobacter*. A80 llegó a tener una DO de 1,30 y un recuento celular de $11,6 \times 10^8$ cuando el E fue de 4% v/v y el AA 0,5% p/v y el aislado C7 alcanzó una DO de 1,68 y un recuento celular de $6,21 \times 10^8$ cuando el E fue de 6% v/v y el AA 0,5% p/v.

La tolerancia al E de las BAA depende, además, de la temperatura de incubación. Beheshti Maal (2014) en su estudio con bacterias del género *Acetobacter*, aisladas a partir de dátiles fermentados, utilizó el medio Carr (cultivo en placas) con 2,5 y 5% v/v de E, observando que a medida que se aumenta la temperatura de incubación, se necesita mayor tiempo para obtener colonias de BAA, cuando mayor es la concentración de E. Es de destacar que en el presente estudio la temperatura se mantuvo constante, por lo que un retraso en el crecimiento a altas concentraciones de E estaría relacionado sólo con la tolerancia al E de la cepa estudiada.

4.3.3 INFLUENCIA DEL ÁCIDO ACÉTICO

Para evaluar la influencia del AA en el crecimiento, las BAA fueron inoculadas en caldo RAE con 0,5% y 1% p/v de AA. Estas concentraciones se eligieron teniendo en cuenta trabajos previos, Lu et al (1999) observaron que *Acetobacter* sp aislada de vinagres tuvo la mayor productividad cuando la concentración de AA fue del 1% p/v. Además se observó que concentraciones por debajo de 1% favorecen el crecimiento de las BAA, particularmente a bajas concentraciones de E, por encima de 2% p/v el crecimiento es severamente restringido y a 5% de AA es inhibido, cualquiera sea la concentración de E (Nanba et al., 1984). Sin embargo, otros autores estudiando bacterias aisladas de vinagres con alta concentraciones de AA, encontraron que las mismas no pueden crecer en ausencia de AA y que su crecimiento óptimo es entre 2,1% y 4,2% p/v de AA cuando el E fue de 3,84% v/v a 30 °C (Kittelman et al. 1989). En este caso se debe tener en cuenta que las BAA fueron aisladas de

fermentadores donde se producen vinagres por el método sumergido con alta concentración de AA (9-12% p/v), es decir, que dichas bacterias ya están adaptadas a estas concentraciones altas de AA, por lo que valores inferiores podrían inhibir su crecimiento, a diferencia de otros estudios que se realizan con bacterias aisladas de otras fuentes, como es el caso del presente estudio.

Como ya se discutió en el apartado 4.3.1, la concentración de AA influyó en el crecimiento de las BAA, encontrándose mayor cantidad de aislados con recuentos celulares y valores de DO adecuados para la obtención de inóculos, cuando la concentración de AA fue de 0,5% p/v que cuando la concentración de AA fue del 1%. Los resultados alcanzados en este estudio son consistentes con los encontrados en trabajos previos por Sokollek y Hammes (1997) al evaluar el comportamiento de una cepa de *Acetobacter* sp. aislada de un acetificador industrial. Utilizaron caldo RAE con distintas concentraciones de AA (0 a 5% p/v), manteniendo constante la concentración de E en 2,0% v/v, para desarrollar un starter para un acetificador a escala piloto, encontrando que las BAA no necesitan el AA para crecer, ya que cuando no hubo AA en el medio, se obtuvo el mayor valor de DO, el mayor recuento celular y el mayor rendimiento en la producción de AA, no obstante, estos valores fueron muy similares a los hallados cuando la concentración de AA fue de 1%. Sin embargo, otros estudios demuestran que cepas de *Acetobacter* necesitan concentraciones mayores al 2%p/v de AA para crecer con una fase de latencia corta (Sokollek et al. 1998).

El efecto activador del AA cuando éste se encuentra al 1% encontrado por Nanba et al. (1984) fue observado en los aislados A70, C3 y C9 cuando la concentración de E fue de 4 y 6% de E, mientras que para los aislados A80 y A210 dicho efecto sólo se observó cuando la concentración de etanol fue del 4% y en el aislado A50 cuando la concentración de E fue de 6%. Este efecto se tradujo en una disminución de la fase de latencia y en el mayor recuento celular.

4.3.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

La evolución del proceso de acetificación fue monitorizado mediante la evaluación de la concentración de AA a lo largo del tiempo ensayado (72 horas), cada 24 horas. La producción de AA de las BAA estudiadas está representada en las Figuras 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9.

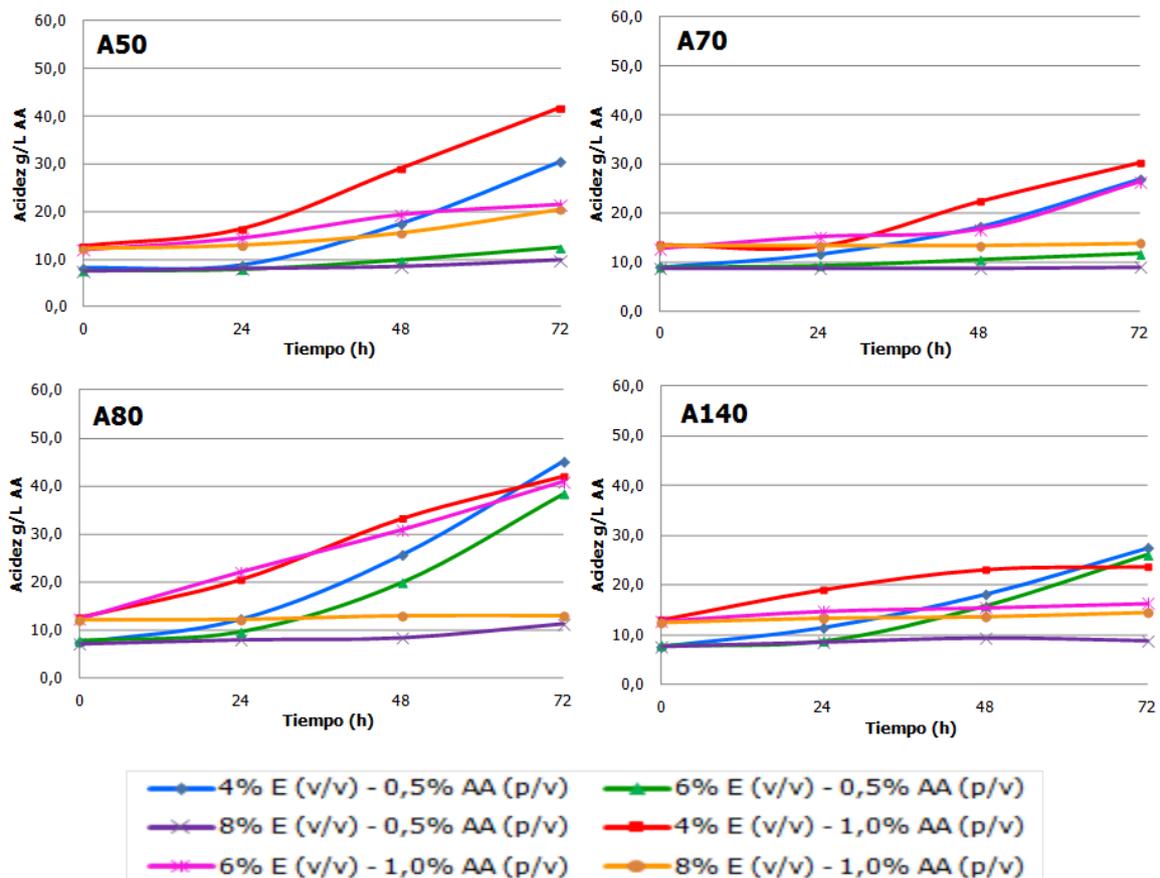


Figura 4.6 Producción de AA de los aislados A50, A70, A80 y A140, en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

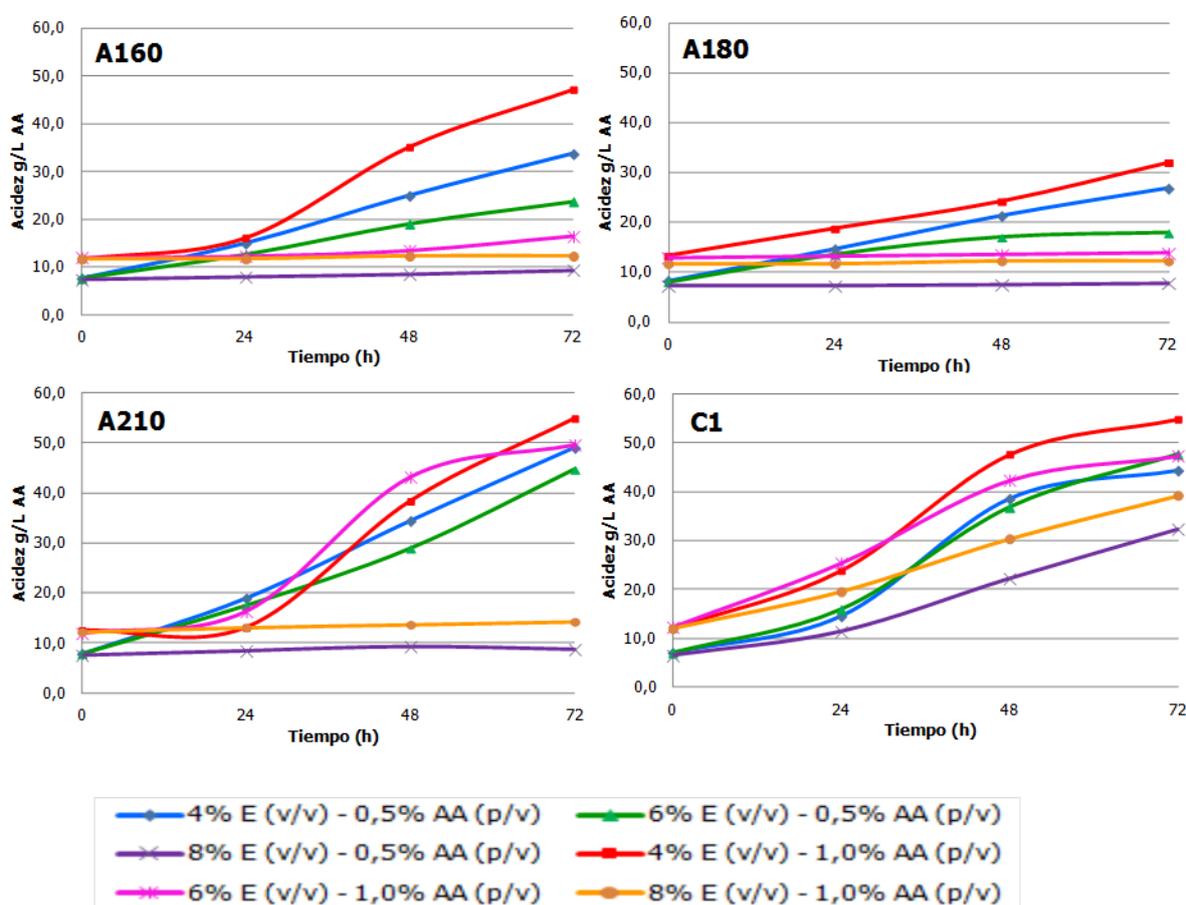


Figura 4.7 Producción de AA de los aislados A160, A180, A210 y C1 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

Durante los estudios de acetificación se esperaba observar una buena producción de AA, sobre todo en los aislados identificados como *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, sin embargo en algunos de los aislados clasificados como *Acetobacter* (A50 y A140) y *Gluconacetobacter* (A70) no se obtuvo la concentración de AA esperada. En cambio, para los aislados identificados como *Gluconobacter* (A80 y C7), para los cuales no se pensaba encontrar buenos rendimientos de producción de AA, se observó un comportamiento inverso. Así para el aislado A80 se alcanzaron a las 72 horas, valores de AA de 45,12;

38,46; 42,09 y 40,88 g AA/L cuando las condiciones fueron 4% E y 0,5% AA; 6% E y 0,5% AA; 4% E y 1% AA y 6% E y 1% AA respectivamente. Estas concentraciones de AA fueron muy similares a las encontradas para aislados identificados como *Acetobacter*, y publicados por otros autores (Lu et al. 1999; Moonmangmee et al. 2003). Para *Acetobacter* sp (aislada a partir de alimentos fermentados típicos de Tailandia) el mayor rendimiento en la producción de AA se obtuvo cuando la misma fue inoculada en 6% v/v de E, siendo el mismo 32,4 g/L de AA (Moonmangmee et al. 2003); en el mismo estudio se reporta para *A. tropicalis* un rendimiento de AA del 40,0 g/L partiendo de una bebida alcohólica típica de Tailandia (Sato) con el 5% de E y en condiciones de agitación.

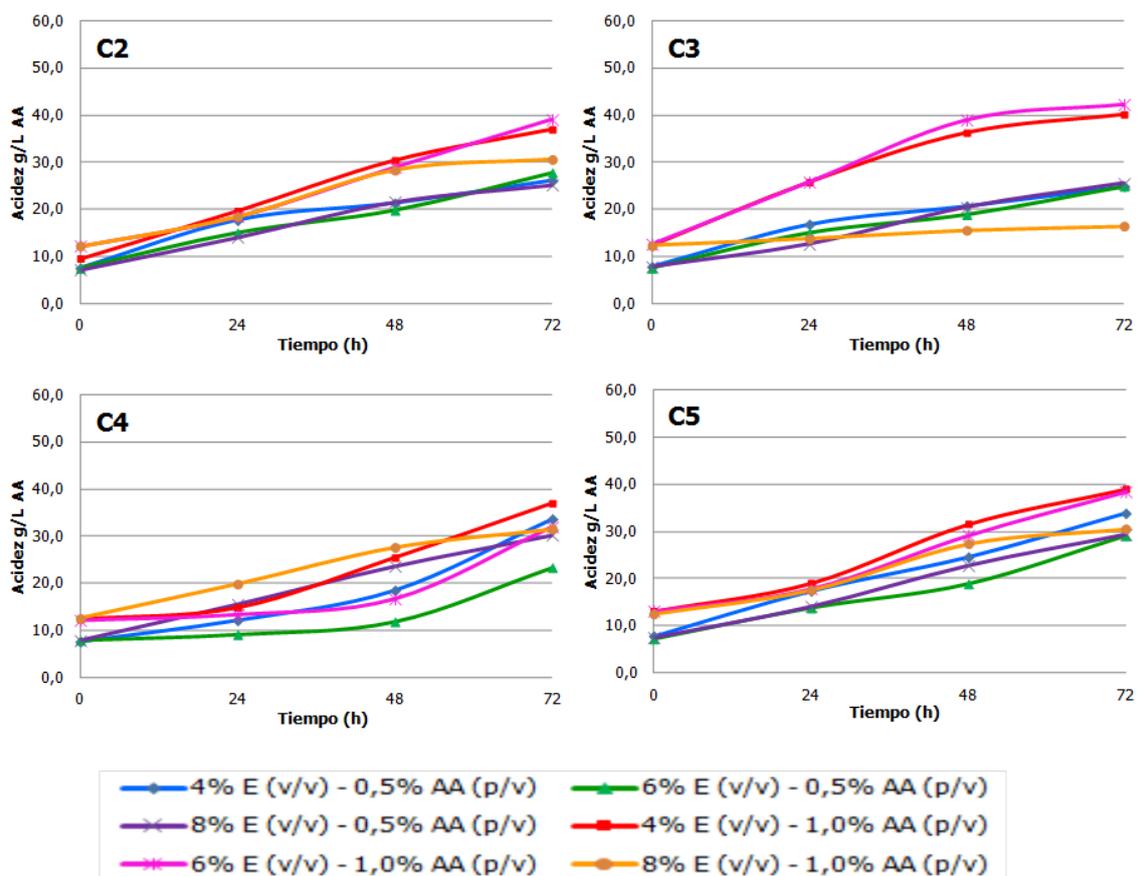


Figura 4.8 Producción de AA de los aislados C2, C3, C4 y C5 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

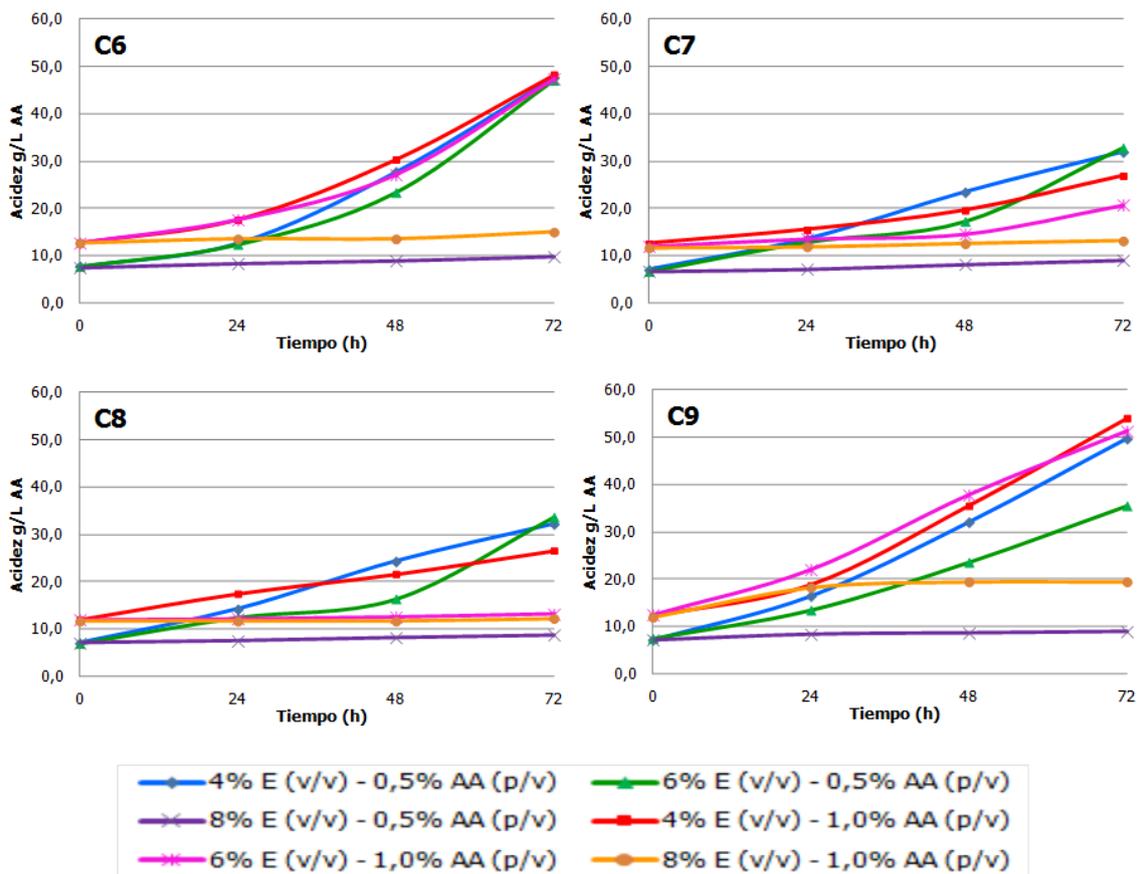


Figura 4.9 Producción de AA de los aislados C6, C7, C8 y C9 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

Cuando se realizaron estudios de acetificación para *Acetobacter* sp y *Acetobacter aceti* manteniendo constante la concentración inicial de AA en 2% p/v y modificando la concentración de E de 0 - 10 % v/v, se encontró que la producción de AA aumenta a medida que se aumenta la concentración de E de 1 a 5% v/v, a 5% de E se observa el pico máximo de producción de AA y luego cuando se ensayaron concentraciones de E de 5- 10% v/v, la producción de AA fue decayendo y a partir de 8% de E, la producción de AA fue prácticamente nula (Lu et al. 1999). Los resultados alcanzados por Lu son similares a los

hallados en este estudio para los aislados C9, A80 y A210, observamos que los mismos produjeron concentraciones de AA altas cuando el E fue del 4 y 6% v/v, pero no produjeron AA cuando la concentración de E fue del 8%. La máxima concentración de AA alcanzada por *Acetobacter* sp fue de 43,6 g/L cuando la concentración de E fue del 5% v/v (Lu et al. 1999), valor ligeramente inferior que los alcanzados en éste estudio para los aislados C1, C9 y A210. Para C1, los mismos fueron 44,34; 47,66; 54,88; 47,37 g AA/L cuando las condiciones fueron 4% E y 0,5% AA, 6% E y 0,50% AA, 8% E y 0,50% AA, 4% E y 1% AA, 6% E y 1% AA, 8% E y 1% AA respectivamente; para C9 49,68; 35,80; 54,01 y 51,24 g AA/L para 4% E y 0,5% AA, 6% E y 0,50% AA, 4% E y 1% AA, 6% E y 1% AA, respectivamente y en el aislado A210, 49,11; 44,72; 54,96 y 49,69 g AA/L, respectivamente.

4.3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ACETIFICACIÓN

La velocidad de acetificación se obtuvo de acuerdo a lo detallado en la metodología. Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 4.1. Algunos de los aislados: C1, C2, C4, C5, C9, A80 y A210 produjeron altas concentraciones de AA, lo que redundó en una alta VA en las condiciones de E y AA ensayadas (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16). Los aislados C2, C4 y C5 presentaron bajas VA respecto de los otros aislados antes mencionados en todas las condiciones ensayadas, en cambio los aislados C9, A80 y A210, alcanzaron altas VA cuando la concentración de E fue del 4 y 6% v/v en las dos concentraciones de AA estudiadas y valores de VA muy bajos cuando el E fue de 8% v/v para las dos concentraciones de AA. El aislado C1 mostró mayor uniformidad en los valores VA, para todas las condiciones estudiadas.

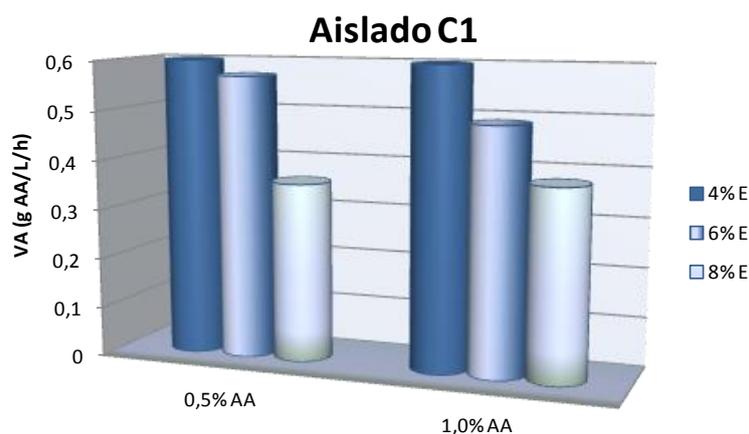


Figura 4.10 Velocidades de acetificación para el aislado C1 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

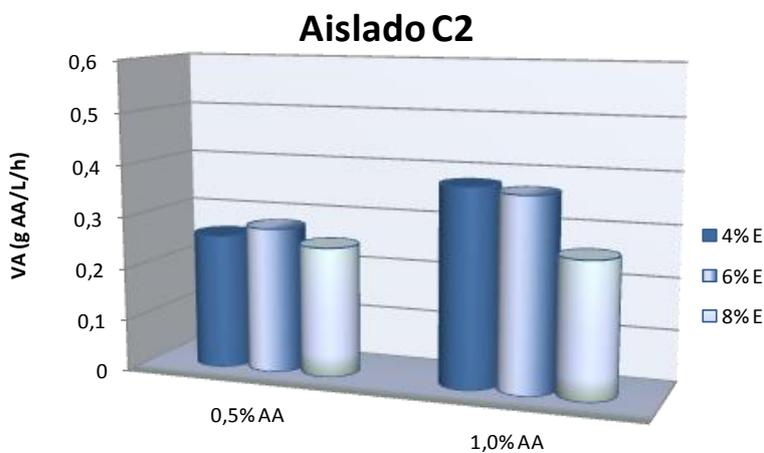


Figura 4.11 Velocidades de acetificación para el aislado C2 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

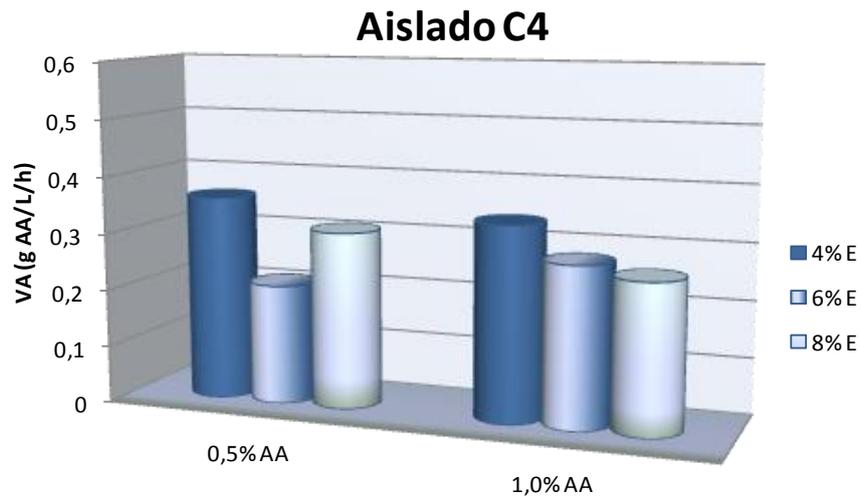


Figura 4.12 Velocidades de acetificación para el aislado C4 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

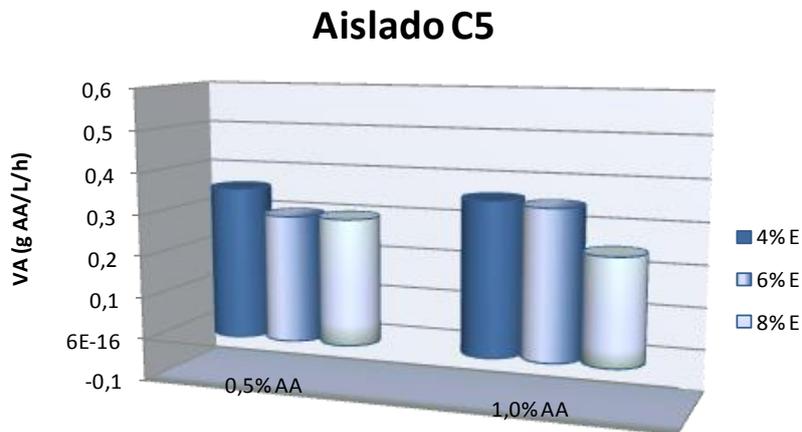


Figura 4.13 Velocidades de acetificación para el aislado C5 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

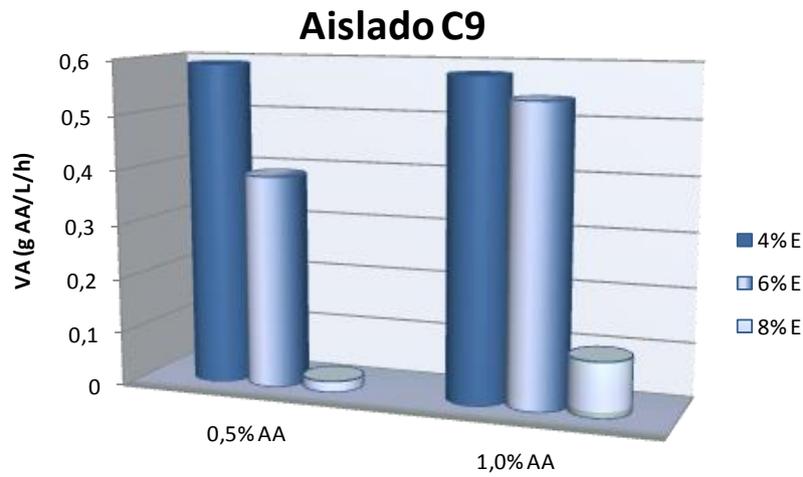


Figura 4.14 Velocidades de acetificación para el aislado C9 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

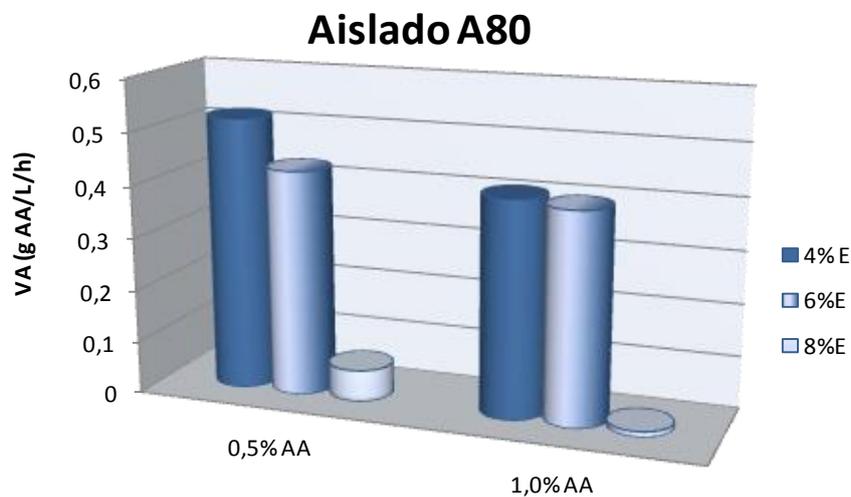


Figura 4.15 Velocidades de acetificación para el aislado A80 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA.

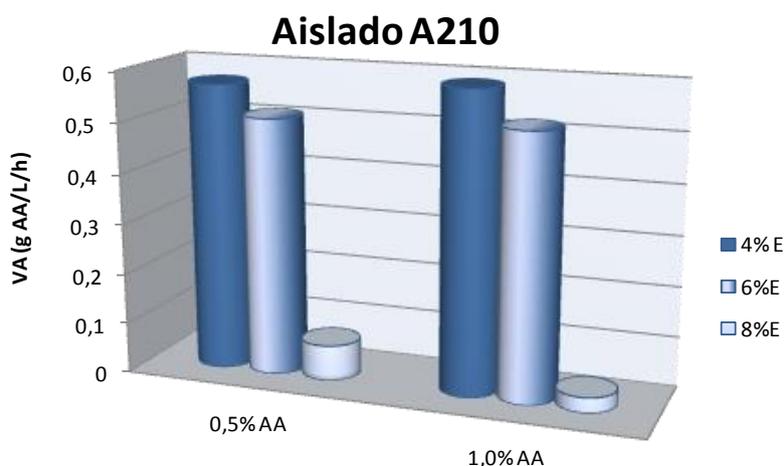


Figura 4.16 Velocidades de acetificación para el aislado A210 en caldo RAE a 30 ± 1 °C y 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 8% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, 8% E - 1% AA

Algunos autores reportan valores de productividad para las BAA; así Sokollek y Hammes (1997) evaluaron la productividad (g AA/L/h) de una cepa de *Acetobacter* en caldo RAE manteniendo constante la concentración de E a 2% v/v y variando la concentración de AA de 0 a 5% p/v, encontrando que los mejores rendimientos en la acetificación se produjeron cuando no había AA en el medio (0,491 g AA/L/h) y cuando la concentración de AA fue de 1% (0,412 g AA/L/h); por su parte, Ndoye (2006) compararon el crecimiento y la producción de AA en bacterias aisladas a partir de frutas de la región Sub-Saharan (Africa) con *A. pasteurianus* LMG 1625, encontrando que ésta última puede crecer y producir AA a 30 °C con una productividad de 0,458 g/L/h, pero dicha productividad disminuye notablemente cuando la temperatura asciende a 35 °C y prácticamente es nula a 38 °C; por otra parte Silva et al. (2007) encontraron los mayores valores de productividad (0,55 g/L/h) cuando la concentración de E entre 4,8 y 6% v/v y el AA entre 1 y 1,3% p/v. Valores muy similares o ligeramente superiores a éstos fueron los hallados en este estudio, ya que los máximos valores encontrados fueron para el aislado A210: 0,57; 0,51; 0,59,

0,52 g AA/L/h para 4% E - 0,5% AA, 6% E - 0,5% AA, 4% E - 1% AA, 6% E - 1% AA, respectivamente.

4.4 CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la dinámica de crecimiento y la habilidad para producir AA por parte de BAA aisladas de arándanos y frutas cítricas, con el fin de elegir las más aptas para la acetificación de mostos de frutas.

El crecimiento se evaluó con distintas concentraciones de E y AA teniendo en cuenta que valores altos de los recuentos celulares son considerados esenciales para los inóculos destinados al arranque en la producción de vinagre, a fin de lograr una fase de latencia corta y de esta manera disminuir tiempos de proceso lo que redundaría en bajos costos de producción.

En este sentido, los aislados A80, A210, C2, C3 y C5 en medio con 4% v/v de E y 0,5% p/v de AA lograron alcanzar recuentos superiores a 10^9 células/mL. De igual manera el aislado C5 logró superar dicho valor, pero para 4% v/v de E y 1,0% p/v AA.

El aislado A210 alcanzó un alto recuento celular y también tuvo alta productividad, por lo tanto se podría utilizar como un cultivo iniciador en una fermentación acética.

A pesar que los aislados C1 y C9 sólo alcanzaron recuentos de 10^8 células/mL, valor ligeramente al recomendado, poseen una alta capacidad de producción de AA cuando la concentración de E se encuentra entre 4 y 6% v/v.

Por lo expuesto, los aislados A210, C1 y C9 (identificados previamente como *Acetobacter*) y A80 (*Gluconobacter*) podrían ser utilizados como inóculo para la elaboración de vinagres.

4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameyapoh, Y., Yves Leveau, J., Karou, S., Bouix, M., Sossou, S. y De Souza, C. (2010). Vinegar Production from Togolese Local Variety Mangovi of Mango *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(3), 132-137.
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M. y Barja, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(2), 75–81.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 152–61.
- Beheshti Maal, K. (2014). Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. *Advances in Environmental Biology*, 8(10), 1063–1071.
- Beheshti Maal, K. y Shafiee, R. (2010). Characterization of an *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach that tolerates high temperatures and ethanol concentrations. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 38(2), 131–135.
- Beheshti Maal, K. y Shafiee, R. (2011). A Thermotolerant *Acetobacter* Strain Isolated from Iranian Peach Suitable for Industrial Microbiology. *Asian Journal of Biological Sciences*, 4(3), 244–251.
- Ciani, M. (1998). Wine vinegar production using base wines made with different yeast species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(2), 290–294.

- De Ory, I., Romero, L. y Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- De Ory, I., Romero, L. y Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Elvir Mairena, R. J. (1993). Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Revista Medica Hondureña*, 61(1), 20–24.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. y Guillamon, J. M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 853–860.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–212.
- Gullo, M., De Vero, L. y Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2585–2589.
- Gullo, M. y Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 46–53.
- Hidalgo, C., Torija, M., Mas, A. y Mateo, E. (2013). Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 34(1), 88–94.

- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A., Callejón, R., Torija, M. (2010). Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 56–62.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J. y Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 245–249.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Yakushi, T., Toyama, H., Adachi, O. y Matsushita, K. (2010). Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 741–51.
- Kántor, A., Kacaniova, M., Jaroslav, P., Petrová, J., Hleba, L., Felsociova, S., Bobkova, A. (2013). Lactic acid and acetic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(1), 1704–1715.
- Kittelmann, M., Stamm, W., Follmann, H. y Triiper, H. (1989). Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology*, 30, 47–52.
- Lu, S., Lee, F. y Chen, H. (1999). A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14 – 2. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 55–62.
- Mandigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). *Brock, Biología de Los Microorganismos*. (P. Hall, Ed.) (12º Edición). Madrid, España.
- Mas, A., Torija, M., García-Parrilla, M. y Troncoso, A. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, ID 394671,1–7.

- Matsutani, M., Nishikura, M., Saichana, N., Hatano, T., Masud-Tippayasak, U., Theergool, G., Matsushita, K. (2013). Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 109–119.
- Moonmangmee, D., Taloadtaisong, Rangsan Saowaro, S., Moonmangmee, S. y Tanasupawat, S. (2003). Vinegar Making From Thai Traditional Alcoholic Beverage, Satoh. *KMUTT annual research abstracts*. Bangkok. Thailand, ISBN 974-456-528-4. [Consulta: 10 de septiembre 2014]. Disponible en: WWW.agriqua.doe.go.th/.../P_2_Duangtip.pdf
- Nanba, A., Tamura, A. y Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62(6), 501–505.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Dubois-Dauphin, R., Guiro, A., Van Trappen, S., Thonart, P. (2007). *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1576–1581.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A., Kere, C., Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 916–923.
- Nie, Z., Zheng, Y., Wang, M., Han, Y., Wang, Y., Luo, J. y Niu, D. (2013). Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar. *Bioresource Technology*, 148, 325–333.
- Nieto, F. J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. In C. Llaguno Marchena y M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (69–103). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

- Raspor, P. y Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124.
- Rivera, J. y Lima, E. (2013). Efecto desorbedor del metanol en la membrana celular. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 93–97.
- Saeki, A. (1993). Application of *Gluconobacter oxydans* subsp. *sphaericus* IFO 12467 to vinegar production. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(3), 232–234.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. y Adachi, O. (1997). Development of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Useful for Vinegar Fermentation at Higher Temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 138-145.
- Sengun, I. y Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647–656.
- Sharafi, S., Rasooli, I. y Behesthti-Maal, K. (2010). Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 38–45.
- Silva, L., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M., Willems, A. y Velázquez, E. (2006). *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 21–4.
- Silva, M., Torres Neto, A., Silva, W., Silva, F. y Swarnakar, R. (2007). Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. *Brazilian of Chemical Engineering*, 24(02), 163–169.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 3195–3206.

- Sokollek, S. y Hammes, W. (1997). Description of a Starter Culture Preparation for Vinegar Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 481–491.
- Soo Park, Y., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. y Toda, K. (1989). Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(2), 96–101.
- Sossou, S., Ameyapoh, Y., Karou, S. y De Souza, C. (2009). Study of Pineapple Peelings Processing into Vinegar by Biotechnology. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(11), 859-865.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. y Troncoso, A. (2000). Set up and Optimization of a Laboratory Scale Fermentor for the Production of Wine Vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.
- Tesfaye, W., Morales, M., García, M. y Troncoso, A. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science y Technology*, 13, 12–21.
- Tokunaga, H., Tanaka, H., Hashiguchi, K., Nagano, M., Arakawa, T. y Tokunaga, M. (2009). Rapid detection of acetic acid bacteria in the traditional pot-fermented rice vinegar *Kurozu*. *Food Science and Technology Research*, 15(6), 587–590.
- Valera, M., Torija, M., Mas, A. y Mateo, E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 46, 452–462.
- Vegas, C., González, Á., Mateo, E., Mas, A., Poblet, M. y Torija, M. (2013). Evaluation of representativity of the acetic acid bacteria species identified

by culture-dependent method during a traditional wine vinegar production. *Food Research International*, 51, 404–411.

Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J., Poblet, M. y Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 130–136.

Wang, Z., Yan, M., Chen, X., Li, D., Qin, L., Li, Z. y Liang, X. (2013). Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 41–45.

Wu, J., Gullo, M., Chen, F., y Giudici, P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* Strains Isolated From Solid-State Fermentation of Cereal Vinegars. *Current Microbiology*, 60(4), 280-286.

Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. y Nakagawa, Y. (2012a). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849–859.

Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. y Nakagawa, Y. (2012b). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 397–404.

Yuan, Y., Feng, F., Chen, L., Yao, Q. y Chen, K. (2013). Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar. *European Food Research and Technology*, 236(3), 573–578.

CAPÍTULO N° 5

***IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL
ÁCIDO ACÉTICO POR PCR-RFLP***

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES

Las primeras herramientas que se utilizaron para identificación y clasificación de las BAA, al igual que para otros microorganismos, fueron el estudio del conjunto de las características celulares observables y cuantificables, como las morfológicas, las propiedades bioquímicas y/o fisiológicas; es decir, que la identificación se lograba por comparación de las características fenotípicas. Estas incluyen la determinación de actividades enzimáticas, capacidades metabólicas, determinantes antigénicos, o susceptibilidad a agentes bactericidas, entre otros (Mandigan et al. 2009). Sin embargo, con el desarrollo de los nuevos métodos de la Biología Molecular, las características genotípicas, que involucran el estudio del genoma de los microorganismos, han alcanzado mayor relevancia, siendo estas las más utilizadas para la tipificación de microorganismos (Vílchez y Alonso 2009). No obstante, a pesar de que las pruebas fenotípicas son largas, tediosas y en algunos casos poco confiables, son ensayos complementarios necesarios en la identificación de los microorganismos y no deben ser sustituidos o eliminados (Vílchez y Alonso 2009); de hecho, siguen siendo utilizados por varios investigadores para la identificación de las BAA (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2001; Jojima et al. 2004; Loganathan y Nair 2004; Yukphan et al. 2005, 2006; Malimas et al. 2007; Cleenwerck et al. 2007; Yamada et al. 2012a).

Una de las técnicas moleculares más sencillas, y de las primeras empleadas para la clasificación taxonómica de bacterias, consiste en determinar el porcentaje de guanina (G) y citosina (C) presente en su ADN. En este caso se realiza la extracción del ADN de una colonia pura y por espectrometría se determina el porcentaje de GC. Esta técnica tiene la desventaja de no poder identificar especies, sólo se pueden identificar bacterias a nivel de género. Es

decir, que el contenido de GC no proporciona información filogenética ni permite asignar un organismo a un determinado taxón (Tortora et al. 2007).

Los métodos moleculares para genotipificación son variados y pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: a) aquellas basadas en el estudio del electrocariotipo (de un segmento del genoma o del genoma completo) mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), b) aquellas en las cuales se obtienen perfiles mediante la hibridación de los ácidos nucleicos, c) las relacionadas con la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasas (PCR) y d) las que involucran la secuenciación parcial o total del genoma de los microorganismos (Vílchez y Alonso 2009).

5.1.2 TÉCNICAS BASADAS EN PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) implica la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento de ADN con el auxilio de cebadores específicos. Es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos, se basa principalmente en realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo. Se han desarrollado técnicas rápidas basadas mayoritariamente en la PCR para llevar a cabo estudios rutinarios de identificación. Éstas técnicas dan como resultado agrupamientos de microorganismos que no son concluyentes a nivel taxonómico y por lo tanto, requiere de la comprobación mediante técnicas con valor taxonómico, como son la hibridación DNA-DNA o la secuenciación de genes ribosomales (Jara 2009). Se pueden clasificar en dos grupos dependiendo del grado de polimorfismo obtenido: las que discriminan a nivel de especie y las que discriminan a nivel de cepa.

5.1.2.1 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

Para realizar la identificación a nivel de especie de las BAA se pueden utilizar las siguientes técnicas:

PCR-RFLP del gen 16 ARNr: el ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Se fundamenta en la amplificación del gen ribosomal 16S y su digestión con diversas enzimas de restricción. El gen ribosomal 16S está altamente conservado pero con la variabilidad suficiente para hacer distinciones entre géneros y especies (Figura 5.1) (Poblet et al. 2000; Bou et al. 2011). La combinación de diferentes enzimas permite la identificación de prácticamente todas las especies de BAA (González et al. 2006a). Es un método rápido, fiable, y en el que se invierte poco tiempo para la identificación de BAA a nivel de género y especie, tiene una alta reproducibilidad de los patrones de restricción (Ruiz et al. 2000; González et al. 2004, 2005, 2006a; Prieto et al. 2007; Ilabaca et al. 2008; Guillamón y Mas 2009; Sharafi et al. 2010; Hidalgo et al. 2013). Sin embargo, a veces no discrimina entre especies muy próximas por el alto grado de similitud en la secuencia del gen ribosomal 16S (Vegas 2011). Es una técnica que ha sido muy utilizada para identificar las BAA (Ruiz et al. 2000; Poblet et al. 2000; González et al. 2004, 2006a; Prieto et al. 2007; Ilabaca et al. 2008; Sharafi et al. 2010; Vegas et al. 2010; Hidalgo et al. 2012, 2013a; Navarro et al. 2013).

PCR-RFLP del espaciador intergénico 16S-23S ARNr: esta técnica consiste en amplificar la región intergénica (ITS) comprendida entre los genes ribosomales 16S y 23S (Figura 5.1), y luego digerir los amplificados con enzimas de restricción (Ruiz et al. 2000; Trcek 2005; Kretová y Grones 2005; González et al. 2006a; Gullo et al. 2006; Trcek y Teuber 2002; Valera et al. 2011; González y Mas 2011). Las secuencias intergénicas 16S-23S (ITS) tienen un mayor grado de variación que las secuencias de los genes ribosomales 16S y 23S. Esto se debe a que la mayoría de las bacterias tienen varias copias del operón ribosómico, en cada una de ellas, la longitud y la secuencia de los

distintos fragmentos intergénicos pueden variar (Trcek y Teuber 2002; Kretová y Grones 2005). Es por esto que el análisis de los polimorfismos de los fragmentos intergénicos amplificados puede constituir en sí mismo, o combinado con posterior digestión o secuenciación, una técnica útil para la discriminación a nivel de género, especie y cepa (Ruiz et al. 2000; Trcek y Teuber 2002; Yukphan et al. 2004a, 2004b; Tanasupawat et al. 2004, 2009; González et al. 2005; Trcek 2005; Kretová y Grones 2005; Vu et al. 2007; Kommanee et al. 2008; Hidalgo et al. 2012, 2013a; Navarro et al. 2013).

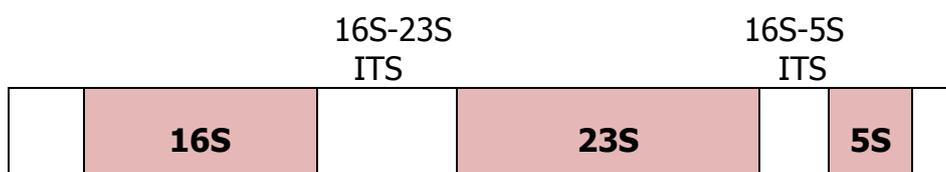


Figura 5.1 Esquema de los genes que codifican para ARNr en procariotas y sus regiones espaciadoras ITS.

PCR-RFLP del 16S-23S-5S ARNr: se amplifican los genes ribosomales 16S, 23S y 5S junto con las zonas intergénicas correspondientes (Figura 5.1), obteniéndose un producto de 4500 pb, el cual se digiere con la enzima *RsaI*. Los resultados presentan un alto polimorfismo entre las distintas especies (Gullo et al. 2006). La principal desventaja de éste método es el gran tamaño del amplificado.

PCR-AFLP (análisis de polimorfismos amplificados): se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción generados a partir de la digestión del ADN genómico. Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*) y cebadores fluorescentes (Cleenwerck et al. 2009; Li et al. 2014). Las ventajas de este método son su elevada sensibilidad, su reproducibilidad y su excelente poder de discriminación, sin embargo es una técnica laboriosa, costosa y se requiere un software para el análisis de los patrones de bandas que se obtienen (Fernández Cuenca 2004). (Cleenwerck et al. 2009; Li et al. 2014).

Análisis del gen que codifica la subunidad I de la alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiendo la quinona de pirroloquinolina (PQQ-ADH): se ha utilizado el análisis de la secuencia parcial del gen de la alcohol deshidrogenasa (*adhA*) dependiente de la PQQ para la identificación de algunas especies, ya que dicha secuencia presenta zonas conservadas como variables entre las diferentes especies de BAA, lo que permite el diseño tanto de oligonucleótidos generales como específicos para especie. Trcek (2005), la utilizó para detectar BAA y particularmente, *Acetobacter aceti* de vinagres de sidra.

PCR-DGGE (PCR-electroforesis en gel con gradiente desnaturizante): consiste en la amplificación de una región del genoma y su posterior separación mediante electroforesis desnaturizante. Normalmente se amplifican los genes ribosomales 16S y 23S porque, aunque son regiones muy conservadas que presentan pequeñas variaciones, permiten la identificación a nivel de especie. El ambiente desnaturizante se crea manteniendo una temperatura uniforme (50-60 °C) y un gradiente lineal con urea y formamida. Se utiliza principalmente para hacer estudios de biodiversidad, ya que no requiere el aislamiento del microorganismo. Los amplificados son separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida con un gradiente lineal desnaturizante ascendente y vertical. Se ha utilizado para determinar la comunidad bacteriana, entre ellas las BAA, durante la fermentación del cacao (García-Armisen et al. 2010) y también en otros estudios (Lopez et al. 2003; De Vero et al. 2006; Haruta et al. 2006; Camu et al. 2007; De Vero y Giudici 2008; Andorrà et al. 2008; Andorra Solsona 2010; Mamlouk et al. 2011; Vegas et al. 2013).

PCR en tiempo real (PCR-RT): ésta técnica detecta en tiempo real la amplificación del fragmento de interés; es decir, que la amplificación y detección se realizan de manera simultánea, midiendo la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo. Ha ganado mucha importancia en los últimos años, debido a que ofrece la posibilidad de identificar y cuantificar especies bacterianas sin necesidad de cultivarlas. Esta técnica ha sido utilizada para detección y recuento de BAA procedentes de vinos y vinagres (González et al.

2006b; Gammon et al. 2007; Andorrà et al. 2008; Torija et al. 2010; Valera et al. 2013, 2015; Kántor et al. 2014; Kim et al. 2015;)

5.1.2.2 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE CEPAS

PCR-RAPD (amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN): esta técnica consiste en realizar una PCR con un único cebador que es más corto de lo normal (10 nucleótidos) y de secuencia arbitraria. El cebador hibrida en puntos al azar en todo el genoma produciendo un gran número de bandas polimórficas y que permite distinguir a nivel de cepa. Es una técnica sencilla y no requiere información previa de la secuencia para el diseño de los primers, sin embargo tiene baja reproductibilidad, lo que hace que aparezcan bandas pocos reproducibles. Es una técnica útil para realizar estudios de diversidad genética y tener una estimación de la relación genética entre diferentes cepas, se la ha usado para caracterizar BAA (Trček y Raspor 1999; Nanda et al., 2001; Bartowsky et al. 2003; Trček et al. 2007).

ERIC-PCR (secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias) y **PCR-REP** (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas): los elementos ERIC y REP son secuencias de DNA, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las enterobacterias y de la mayoría de los grupos bacterianos. Se amplifican las secuencias que se encuentran entre dichas zonas repetidas mediante cebadores que hibridan sobre estos elementos con un alto grado de polimorfismo, que permite obtener patrones únicos a nivel de cepa. Estas técnicas poseen un alto poder de discriminación y resultan sumamente sencillas, no dependen del uso de enzimas de restricción, ni de técnicas electroforéticas especiales, son rápidas, de relativo bajo costo, fáciles de analizar y de excelente reproductibilidad (Vilchez y Alonso, 2009). Han sido utilizadas para identificar BAA (Gonzalez et al. 2004, 2005; Nanda et al. 2001; Vegas et al. 2010; Wu et al. 2010; Valera et al. 2011, 2015; Wu et al. 2012; Hidalgo et al. 2012, 2013a; 2013b).

(GTG)₅-PCR: se basa en la amplificación entre secuencias repetitivas distribuidas a lo largo del genoma, utilizando el primer (GTG)₅ (Camu et al. 2007; De Vuyst et al. 2008; Vegas et al. 2010; Valera et al. 2011; Hidalgo et al. 2012, 2013b; Navarro et al. 2013).

5.1.3 SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La variabilidad del genoma puede ser utilizada para tipificar a los microorganismos en estudio. La secuenciación parcial de los genomas ofrece una alternativa para explorar la diversidad genética de distintas cepas de una misma especie, así como también, proporciona información que contribuye al diseño de nuevas herramientas para una rápida genotipificación. Los protocolos utilizados se aplican con la prueba de PCR, lo cual ofrece la posibilidad de amplificar directamente a partir de la muestra biológica. Estas técnicas poseen elevada reproductibilidad y pueden ser fácilmente estandarizadas (Vilchez y Alonso, 2009).

Los métodos de secuenciación de ADN han evolucionado mucho en los últimos años. El principal método utilizado para la identificación de las BAA implica una amplificación de la región genética (16S ADNr, 16-23S ITS) de interés y posterior purificación del producto de PCR. Este es sometido al proceso de secuenciación usando cebadores fluorescentes o dNTPs marcados. Los productos de reacción de secuenciación se separan entonces con un secuenciador de ADN generalmente usando la tecnología capilar, y durante la separación, los productos fluorescentes etiquetados son automáticamente detectados. Los datos resultantes se almacenan en forma digital y la secuencia final se obtiene por la secuencia de montaje con la ayuda de software especializado (Cleenwerck y De Vos, 2008). (González et al. 2006a; Gammon et al. 2007; Andorrà et al., 2008; Torija et al. 2010).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 BACTERIAS

Se utilizaron 16 BAA aisladas de arándanos: A50, A140, A210 (identificadas previamente mediante pruebas fenotípicas como *Acetobacter*, Capítulo 2), A70 (*Gluconacetobacter*) y A80, A160, A180 (*Gluconobacter*) y C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C9 (*Acetobacter*) y C7 y C8 (*Gluconobacter*) aisladas de frutas cítricas. Las mismas fueron conservadas en caldo GY (1% glucosa, 1% extracto de levaduras) a -20 °C con 20% de glicerol.

Para completar el estudio se tomaron del GenBank las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de las siguientes bacterias: LMG 1262 (*A. pasteurianus*), NBRC 16669 (*G. frateurii*), DSM 15548 (*A. syzygii*), NBRC 3283 (*A. pasteurianus*), NBRC 16470 (*A. tropicalis*), Ni-6b (*A. tropicalis*), LMG 1365 (*G. frateurii*), LMG 23848 (*A. ghanensis*) y NBRC 3271 (*G. japonicus*). Con las mismas se realizaron cortes de restricción virtuales con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 2013) y se construyó el árbol filogenético.

5.2.2 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

Las bacterias en estudio se cultivaron en 5 mL de caldo GY (glucosa 1%, extracto de levadura 1%), en estufa Faeta (Argentina), durante 72 horas a 30±1 °C. Para la extracción de ADN, se utilizó el UltraClean Microbial DNA Isolation kit, comercializado por la empresa Mo Bio Laboratorios, Inc. (Buenos Aires, Argentina). Se siguió el protocolo recomendado por la misma.

Se comprobó la calidad de ADN extraído realizando una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 1X, con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba de electroforesis horizontal ENDURO Gel XL Labnet International Inc. (USA),

durante 45 minutos. Se colocaron en cada pozo 5 µl de ADN genómico con 2 µl de buffer de carga 6X, y se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb (Genbiotech, Argentina). La visualización de las bandas se efectuó en un transiluminador de luz UV de 302 nm Labnet International, Inc (USA), los geles fueron fotografiados utilizando como fotográfico Biodynamic (Argentina) cámara Kodak Z981 (Vietnam). El DNA extraído se conservó por congelación a -20 °C hasta el momento de uso.

5.2.3 CONDICIONES DE PCR

a- Amplificación de ADN ribosomal 16S con iniciadores P1 y P2: para lograr la amplificación del gen ribosomal 16S se utilizaron los cebadores P1 y P2, que amplificaron una región del ADNr 16S de la posición 20 a la 1507 (1450 pb) (Ruiz et al. 2000), tal como se expresa en Tabla 5.1. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 50 µL que contenía 2 µL de ADN templado y 48 µL de mezcla de amplificación. El master mix se formó de la siguiente manera: 10% buffer 1X; agua libre de DNAsas y RNAsas, 3mM de MgCl₂; 0,25mM de cada dNTPs; 20 p moles de P1, 20 p moles de P2 y 2,5 U de GoTaq ADN polimerasa Promega®.

Tabla 5.1 Secuencia y número de bases de los cebadores utilizados para la amplificación del gen ADN 16S.

Primers	Secuencia	Pares de bases (pb)
P1	5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3'	22
P2	5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3'	21

b- Amplificación de ADNr región ITS 16S-23S con iniciadores P3 y P4: para lograr la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S ADNr se utilizaron los cebadores P3 y P4, que amplificaron la región de (750-800 pb) (Ruiz et al. 2000) (Tabla 5.2). La amplificación se llevó a cabo en un volumen

de 50 µL que contenía 2 µL de ADN templado y 48 µL de mezcla de amplificación. El master mix se formó de la siguiente manera: 10% buffer 1X; agua libre de DNAsas y RNAsas, 3mM de MgCl₂; 0,25mM de cada dNTPs; 20 p moles de P3, 20 p moles de P4 y 2,5 U de GoTaq ADN polimerasa Promega®.

Tabla 5.2 Secuencia y número de bases de los cebadores utilizados para la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S ADNr.

Primers	Secuencia	Pares de bases (pb)
P3	5´-ACCTGCGGCTGGATCACCTCC-3´	21
P4	5´-CCGAATGCCCTTATCGCGCTC-3´	21

5.2.4 PROGRAMAS DE PCR

a- La reacción de amplificación (PCR) del gen ribosomal 16S se llevó a cabo en un Termociclador "LONGGENE" MG96G (China), siguiendo el programa mostrado en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Condiciones de amplificación del gen ribosomal 16S

	Etapas	T (°C)	Tiempo
30 ciclos	Desnaturalización	95	2 min
	Desnaturalización	95	30 seg
	Annealing	51	30 seg
	Extensión	72	2 min
	Extensión	72	5 min
	Refrigeración	4	5 min

b- La reacción de amplificación (PCR) del espaciador intergénico 16S-23S ADNr se llevó a cabo en un Termociclador "LONGGENE" MG96G (China), siguiendo el programa observado en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Condiciones de amplificación del espacio intergénico 16S-23S ADNr

	Etapa	T (°C)	Tiempo
	Desnaturalización	95	2 min
30 ciclos	Desnaturalización	95	30 seg
	Annealing	61	30 seg
	Extensión	72	2 min
	Extensión	72	5 min
	Refrigeración	4	5 min

5.2.5 ELECTROFORESIS

Para observar los productos de la amplificación del ADNr 16S se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,0% (p/v) en buffer TBE 1X, con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y para observar los productos de la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2,0% (p/v) en TBE 1X, con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cuba de electroforesis horizontal ENDURO Gel XL Labnet International, Inc. (USA) durante 50 minutos. Se colocaron en cada pozo 5 µl del producto de amplificación con 2 µl de buffer de carga 6X, y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb y 100 pb (Genbiotech), respectivamente. La visualización de las bandas se efectuó en un transiluminador de luz UV de 302 nm Labnet International, Inc. (USA) y los geles fueron fotografiados utilizando como fotográfico Biodynamic (Argentina) y cámara Kodak Z981 (Vietnam).

5.2.6 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

a- Análisis de restricción del ADN ribosomal 16S amplificado: los productos amplificados (1450pb) fueron digeridos con las enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*. Las digestiones se llevaron a cabo por separado con cada una de las enzimas. El mix contenía 4 U de cada una de las enzimas (Fermenta®); 2 µL buffer 10X; 8 µL de producto de amplificación y 9,6 µL de agua libre de DNasas y RNasas, volumen total 20 µL. Las digestiones de las enzimas *TaqI* y *Tru9I* fueron realizadas a 65 °C durante 9 horas, para las otras enzimas el corte se realizó a 37 °C durante 9 horas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las enzimas utilizadas y su correspondiente sitio de corte se encuentran en la Tabla 5.5, fueron elegidas teniendo en cuenta trabajos previos, ya que las mismas producen suficiente polimorfismo que permite distinguir especies (Ruiz et al. 2000; Poblet et al. 2000; González et al. 2006a; Barata et al. 2012)

Tabla 5.5 Enzimas de restricción utilizadas en los ensayos.

Enzima	Sitio de Restricción
<i>AluI</i>	(5'- AG↓CT - 3') (3'- TC↓GA -5')
<i>RsaI</i>	(5'- GT↓AC - 3') (3'- CA↓TG -5')
<i>HaeIII</i>	(5'- GG↓CC - 3') (3'- CC↓GG -5')
<i>TaqI</i>	(5'- T↓CGA -3') (3'- A↓GCT -5')
<i>MspI</i>	(5'- C↓CGG - 3') (3'- GGC↓C -5')
<i>CfoI</i>	(5'- GCG↓C - 3') (3'- C↓GCG -5')
<i>Tru9I</i>	(5'- T↓TAA - 3') (3'- AAT↓T -5')

b- Análisis de restricción del ITS 16S-23S amplificado: los productos amplificados (750 pb) fueron digeridos con las enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*. Las digestiones se llevaron a cabo por separado con cada una de las enzimas. El mix contenía 4 U de cada una de las enzimas (Fermenta®); 2 µL buffer 10X; 8 µL de producto de amplificación y 9,6 µL de agua libre de DNasas y RNasas, volumen total 20 µL. Las digestiones de

las enzimas *TaqI* y *Tru9I* fueron realizadas a 65 °C durante 9 horas, para las otras enzimas el corte se realizó a 37 °C durante 9 horas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las enzimas utilizadas y su correspondiente sitio de corte se encuentran en la Tabla 5.5.

5.2.7. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Los productos de las digestiones enzimáticas del gen ribosomal 16S y del ITS 16S-23S fueron resueltos y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3,5% (p/v) en buffer TBE 1X (con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio). Se evaluó la resolución de los patrones de restricción obtenidos observándose los fragmentos generados en cuanto a número y tamaño y su correspondencia por suma con el tamaño original del cual provinieron. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba de electroforesis horizontal ENDURO Gel XL Labnet International, Inc. (USA) durante 2,5 horas. Se colocó en cada pozo 20 µL del producto de corte con 3 µL de buffer de carga 6X, y se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Genbiotech, Argentina). Las bandas se visualizaron en transiluminador UV de 302 nm Labnet International, Inc (USA) y los geles fueron fotografiados utilizando como fotográfico Biodynamic (Argentina) y cámara Kodak Z981 (Vietnam).

5.2.8 TRATAMIENTO DE DATOS PARA EL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 última adaptación 12/11/2013.
- Programa InfoStat/L versión 2014.

Para las cepas de referencia (LMG 1262, NBRC 16669, LMG 1365, DSM 15548, NBRC 3283, NBRC 16470, Ni-6b) se realizaron cortes virtuales a partir

de las secuencias parciales del gen 16S tomadas del GenBank, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. La técnica molecular empleada para el análisis de los aislamientos generaron patrones de bandas visualizadas como bandas discretas, que se analizaron y cuantificaron asignándose a cada banda un correspondiente peso molecular (pb), lo que produjo una matriz de peso molecular. A partir de esta matriz, de acuerdo a la presencia o ausencia (1 y 0) de los valores específicos correspondientes a los productos de restricción de cada aislado y cepas de referencia, se creó una matriz binaria. Posteriormente, para estudiar la diversidad de los aislamientos se generó un dendograma de similitud, utilizando el programa InfoStat/L versión 2014 (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. 2014), basado en el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) y el coeficiente de similitud Dice.

5.2.9. SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S

La secuenciación del gen ribosomal 16S se realizó con los productos de PCR obtenidos con los iniciadores P1 y P2. Las muestras se enviaron a la empresa Genbiotech (Buenos Aires, Argentina) para su purificación y posterior secuenciación. En la secuenciación se utilizó el primers (5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT- 3'), descrito por Ruiz et al. (2000). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013) y posteriormente se compararon con las secuencias 16S ADNr de la base de datos del GenBank mediante el software BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al. 1997), para su identificación. Una vez obtenida la identificación, se consideró para cada aislado las secuencias de referencia que presentaron los más altos porcentajes de similitud con la secuencia problema, y posteriormente se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013), empleando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con un bootstrap de 1000 réplicas para evaluar la estabilidad relativa de las ramas del árbol, la distancia

evolutiva fue calculada usando el método Maximum Composite Likelihood. El alineamiento múltiple de las secuencias de los aislados y de las obtenidas en la base de datos, se realizó por CLUSTALW de dicho programa. Se utilizó la cepa *Rhodospila globiformis* DSM 161 como grupo externo.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN para el análisis molecular fue obtenido mediante kit de extracción MOBio. Su calidad fue verificada mediante gel de agarosa según metodología descrita anteriormente en el apartado 5.2.2 (Figura 5.2).

El procedimiento de extracción de ADN empleado para los aislamientos realizados y las cepas patrones permitió obtener, en general, una buena calidad de ADN; sin embargo no se lo pudo cuantificar debido a no tener equipamiento adecuado para realizar dicha técnica.

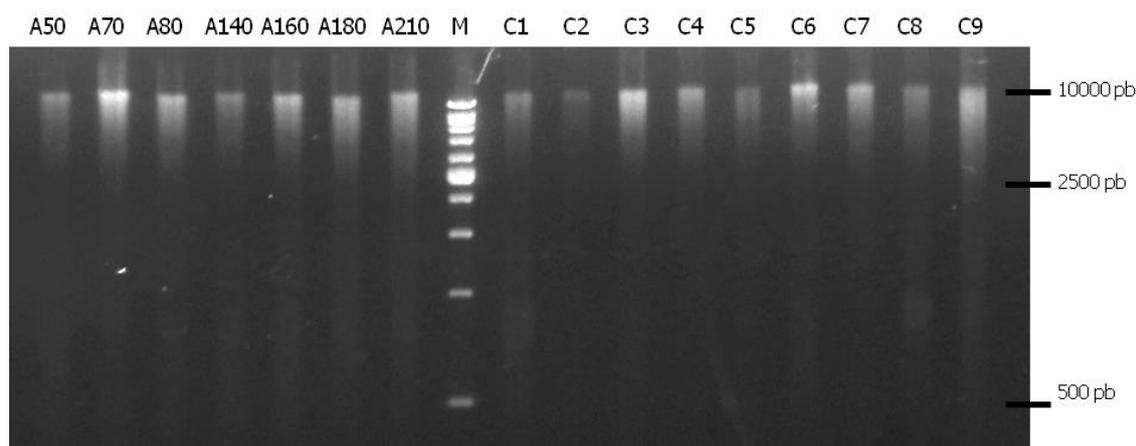


Figura 5.2 ADN extraído utilizando Kit MoBio en gel de agarosa 1% y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (1 Kb).

5.3.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PCR

El resultado ideal de una PCR es un producto relativamente limpio de primers, altamente concentrado (100 ng/uL en adelante) y sin amplificaciones inespecíficas. Este resultado se puede alcanzar estandarizando la reacción de PCR y el programa de amplificación. Para lograrlo, se optimizó la reacción de PCR, probando distintas concentraciones de dNTPs, de cebadores y de ADN molde; también se optimizó el programa de amplificación, modificando la temperatura de annealing y el tiempo de extensión de la cadena en los ciclos de PCR. Las mejores condiciones encontradas fueron las detalladas en la metodología. Con la reacción de PCR del gen ribosomal 16S con los primers P1 y P2 se obtuvo un producto de aproximadamente 1450 pb, ya que este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar géneros y especies (Bou et al. 2011), y con la reacción de PCR de amplificación del espaciador intergénico 16S-23S con los primers P3 y P4 se obtuvo un producto de aproximadamente 750 pb. En las Figuras 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 se observan los productos de PCR obtenidos para ambas reacciones.

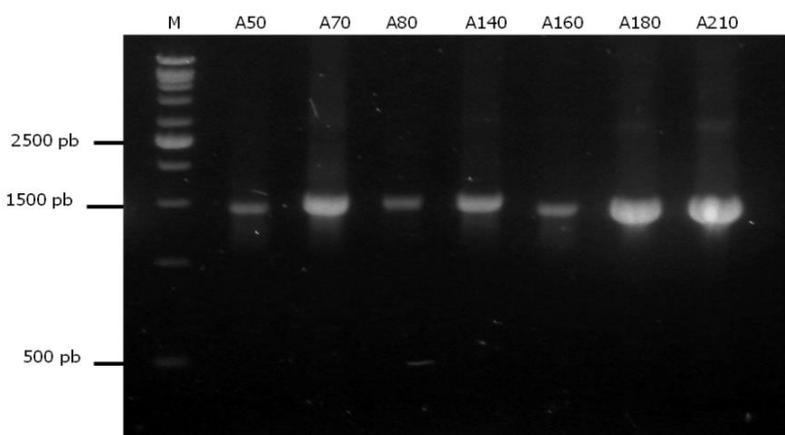


Figura 5.3 Amplificación del gen ribosomal 16S con iniciadores P1 y P2 en las bacterias aisladas de arándanos, en gel de agarosa 1% y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (1 kb)

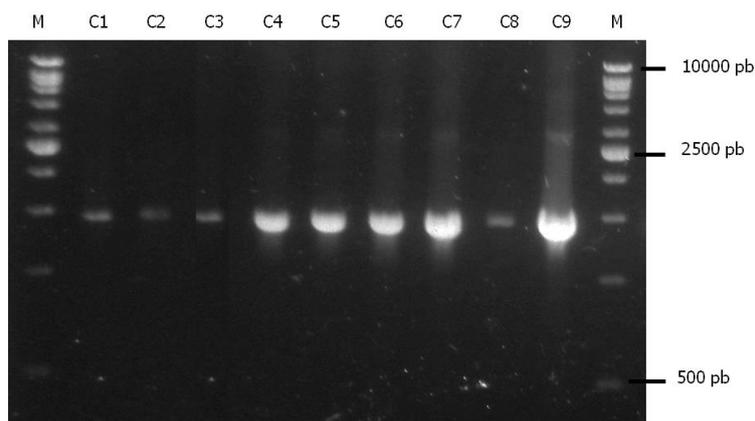


Figura 5.4 Amplificación del gen ribosomal 16S con iniciadores P1 y P2 en bacterias aisladas de frutas cítricas, en gel de agarosa 1% y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (1 kb)

En las Figuras 5.3 y 5.4 se observan algunas bandas más intensas que otras, esto es consecuencia de no poder estandarizar la concentración de ADN utilizado en la reacción de PCR (se trabajó con ADN sin cuantificar, ver apartado 5.3.1), lo cual impide tener un control en el procedimiento de PCR.

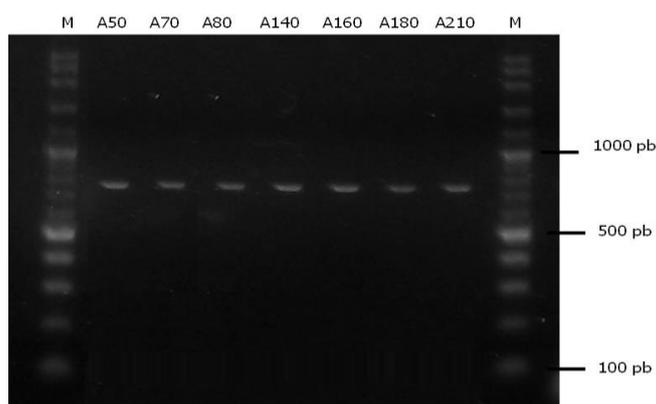


Figura 5.5 Amplificación del espaciador intergénico 16S-23S con cebadores P3 y P4 en bacterias aisladas de arándanos, en gel de agarosa 2% y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

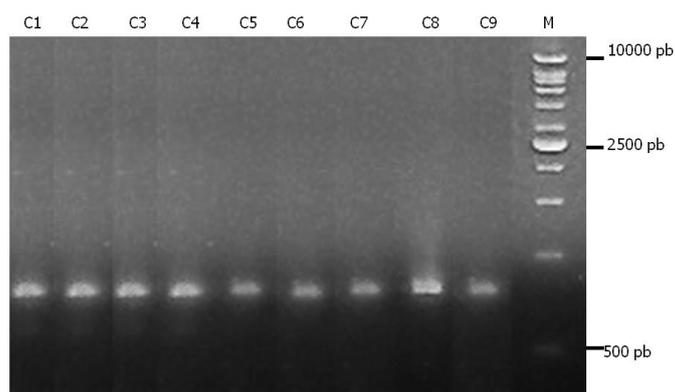


Figura 5.6 Amplificación del espaciador intergénico 16-23S con cebadores P3 y P4 en bacterias aisladas de naranjas, en gel de agarosa 2% y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (1 kb).

5.3.3 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los productos de PCR del gen ribosomal 16S y del espacio ITS 16S-23S fueron digeridos con las endonucleasas detalladas anteriormente. Para algunas enzimas ensayadas, no se contó con bibliografía para constatar los grupos de restricción formados con las mismas, es por eso que se procedió a realizar cortes virtuales con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Para ello se buscó en la base de datos del GenBank las secuencias parciales del gen ribosomal 16S para distintas bacterias, hasta lograr coincidencia con los cortes realizados en el laboratorio.

El análisis de los perfiles de restricción se realizó comparando los patrones de bandas de los aislados obtenidos con las enzimas, con respecto a los informados en la bibliografía para BAA y respecto de los cortes virtuales obtenidos de especies de referencia con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.

5.3.3.1 ENZIMA *RsaI* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

La digestión con esta enzima generó sólo 2 patrones de restricción o morfotipos en las bacterias estudiadas (Tabla 5.6). El morfotipo R1 (aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180) es el mismo que presenta *G. frateurii* y *G. asai* (Ruiz et al. 2000). El morfotipo R2 (aislados C2, C3, C4, C5, C6, C9, A50, A70, A140 y A210) coincide con el patrón de *A. aceti* y *A. pasteurianus* y *Ga. hansenii*, (Ruiz et al. 2000). Las Figuras 5.7 y 5.8 muestran los patrones de restricción generados con la enzima *RsaI* en las bacterias aisladas.

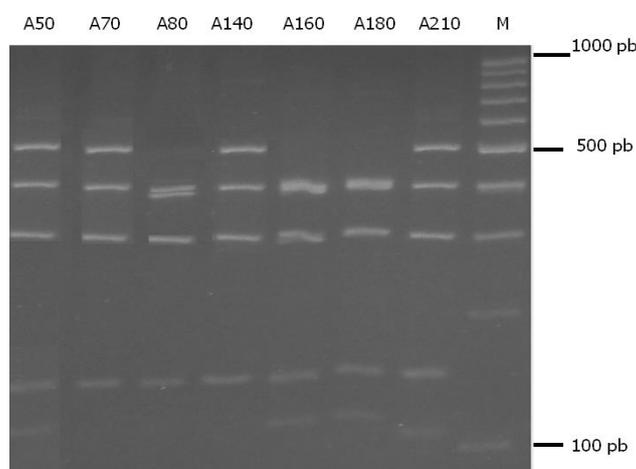


Figura 5.7 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *RsaI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabla 5.6 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *RsaI* para las BAA.

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
R1	C1 - C7 - C8 - A80- A160 - A180	400-400-300-150-120
R2	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - C9 - A50 - A70 - A140 - A210	500-400-300-150-110

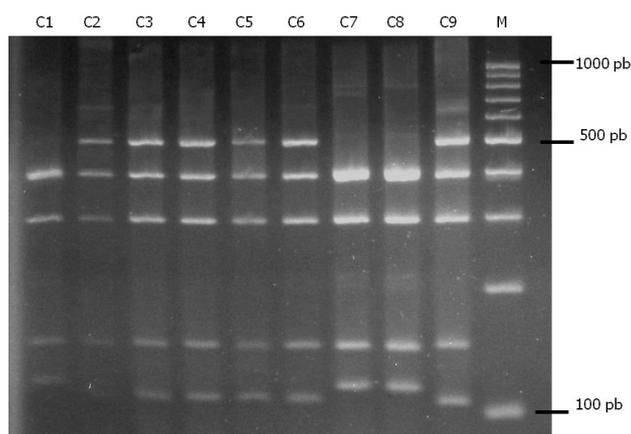


Figura 5.8 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *Rsa*I. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

5.3.3.4 ENZIMA *Msp*I PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

El tratamiento con la enzima *Msp*I produjo 2 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.7). El morfotipo M1 (aislados C1, C7, C8, A80, A160, A180) coincide con los patrones de *G. asaii* LMG 1390 y *G. frateurii* LMG 1365 y también con los de *A. aceti* LMG 1261 y *Ga. hansenii* LMG 1527 (Ruiz et al. 2000). El morfotipo M2 (aislados C2, C3, C4, C5, C6, C9, A50, A70, A140 y A210) coincide con los patrones descritos para *A. pasteurianus* LMG 1262 *Ga. liquefaciens* LMG 1381, *Ga. xilinus* LMG 1515, *Ga. europeus* DSM 6160 y *Ga. hansenii* LMG 1511 (Ruiz et al. 2000). En este caso, para *Ga. hansenii* se tienen dos patrones diferentes, es decir que esta enzima puede generar distintos fragmentos de restricción respecto de la cepa. Las Figuras 5.9 y 5.10 muestran los perfiles de restricción generados con la enzima *Msp*I en las bacterias aisladas.

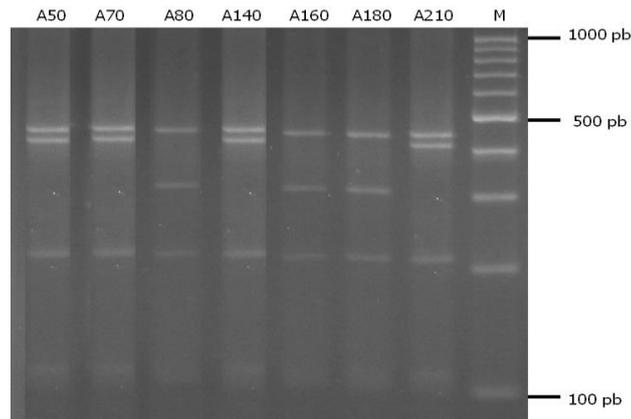


Figura 5.9 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *MspI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

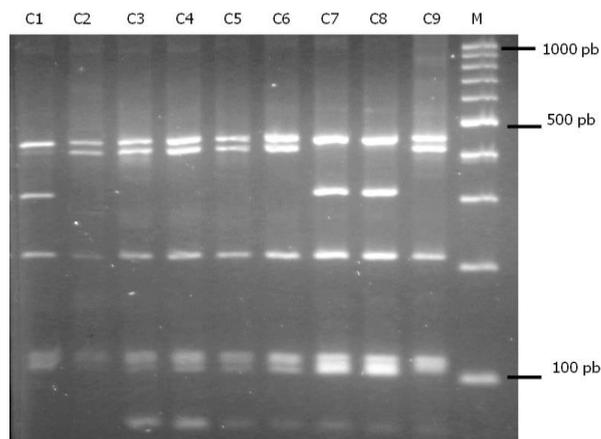


Figura 5.10 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *MspI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabla 5.7 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *MspI* para las BAA.

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
M1	C1 - C7 - C8 - A80 - A160 - A180	450-310-220-120-120
M2	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - C9 - A50 - A70 - A140 - A210	450-425-210-125-125-70

5.3.3.3 ENZIMA *Tru9I* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

La digestión con esta enzima generó 2 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.8). El patrón TR1 coincide con el informado por González et al (2006a) para *A. tropicalis* y *A. indonesiense* y es el que reporta Barata et al. (2012) para *A. tropicalis*. Las Figuras 5.11 y 5.12 muestran los patrones de restricción generados con la enzima *Tru9I* en las bacterias aisladas.

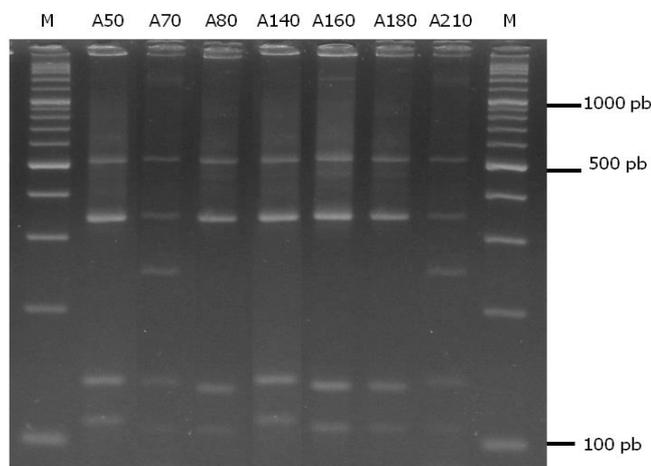


Figura 5.11 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *Tru9I*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabla 5.8 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *Tru9I* para las cepas aisladas en el laboratorio.

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
TR1	A1 - C7 - C8 - A50 - A80 - A140 - A160 - A180	530-350-350-150-110
TR2	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - C9 - A70 - A210	530-350-250-150-110

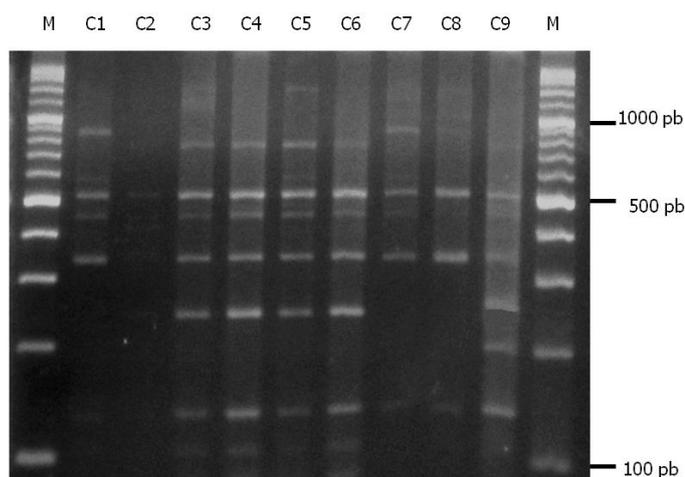


Figura 5.12 Patrones PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *Tru9I*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

5.3.3.4 ENZIMA *HaeIII* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

El tratamiento con la enzima *HaeIII* produjo 3 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.9). El morfotipo H1 (aislados C1, C2, C7, C8, C9, A50, A160 y A180) coincide con los patrones de *G. asaii*, *G. cerinus* y *G. frateurii*, descritos por (Blasco Escrivá 2009). Las Figuras 5.13 y 5.14 muestran los patrones de restricción generados con la enzima *HaeIII* en las cepas aisladas.

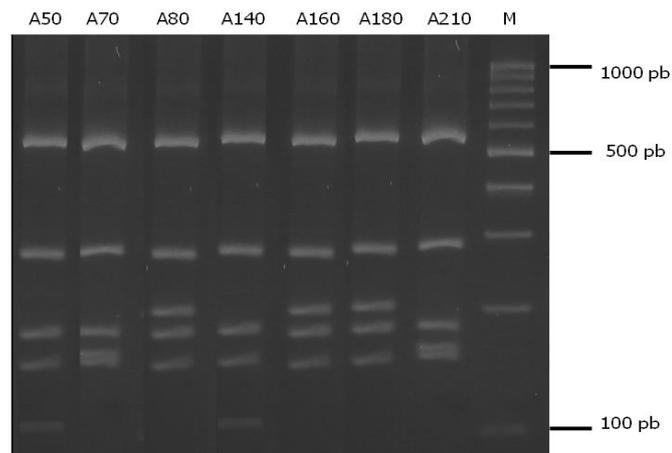


Figura 5.13 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *Hae*III. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 μ g/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

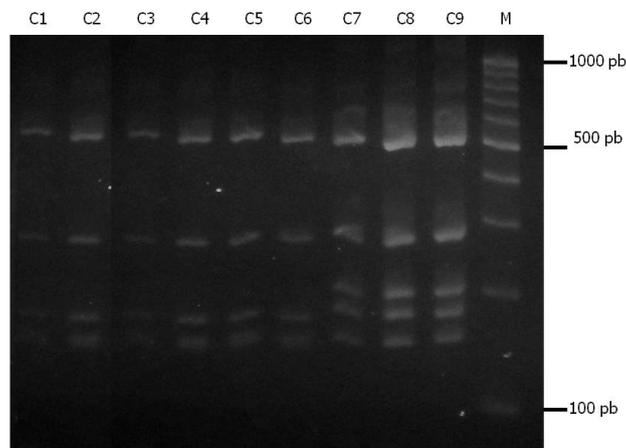


Figura 5.14 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *Hae*III. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 μ g/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabla 5.9 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *HaeIII* para las BAA.

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
H1	C7 - C8 - C9 - A80 - A160 - A180	520-280-200-180-160
H2	A50 - A140	520-280-180-160-120
H3	C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A70 - A210	520-280-180-160-160

5.3.3.5 ENZIMA *A_uI* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

Esta enzima generó 4 patrones de restricción diferentes en las bacterias estudiadas (Tabla 5.10). El morfotipo A1 (aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180) coincide con los patrones de *G. cerinus*, *G. oxydans*, *G. asai* y *G. frateurii* (Ruiz et al. 2000; González et al. 2006a; Blasco Escrivá 2009; Barata et al. 2012). El patrón de restricción A2 (presente para los aislados A50 y A140) coincide con los morfotipos descritos con esta enzima para muchas especies de *Acetobacter*, algunas de ellas pueden ser: *A. tropicalis*, *A. indonesiensis*, *A. cerevisiae*, *A. orleanensis*, *A. malorum*, *A. estunensis* y *A. acetii* (González et al. 2006a; Barata et al. 2012). El morfotipo A3 (aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210) coincide con el patrón de *A. pasteurianus* LMG 1262 (Ruiz et al. 2000) y con el patrón encontrado para esta especie por Blasco Escrivá (2009) y el morfotipo A4 (aislado C9) coincide con el patrón de restricción descrito para *A. syzygii*, *A. lovaniensis*, *A. pomorum* (González et al. 2006a; Barata et al. 2012). En la Figuras 5.15 y 5.16 se observan los patrones de restricción diferentes obtenidos para las bacterias estudiadas.

Tabla 5.10 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *A_{lu}I* para las BAA

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
A1	C1 - C7 - C8 - A80 - A160 - A180	550-290-210-190-120-70
A2	A50 - A140	310-280-230-210-190-120
A3	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A70 - A210	450-310-290-190-190-70
A4	C9	450-310-280-190-120

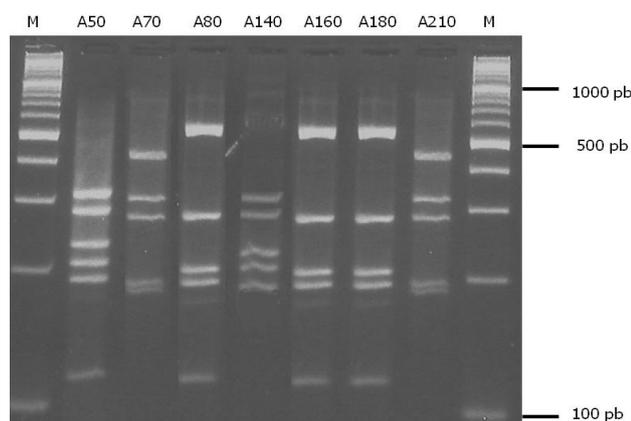


Figura 5.15 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *A_{lu}I*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb)

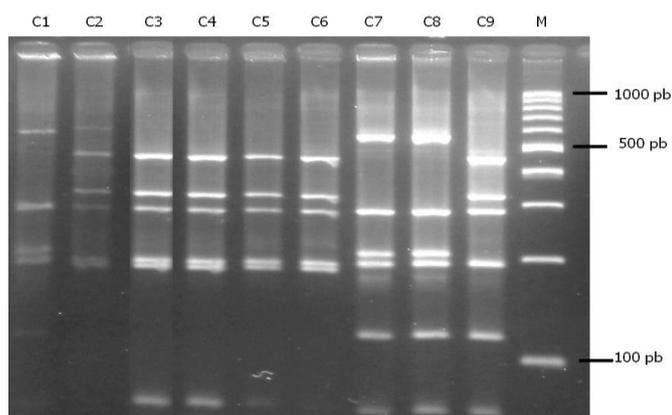


Figura 5.16 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *A_{lu}I*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb)

5.3.3.6 ENZIMA *TaqI* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

La digestión del gen 16S con esta enzima generó 4 morfotipos diferentes en las bacterias estudiadas (Tabla 5.11). El morfotipo T1 (aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180) coincide con los patrones de *G. asaii*, *G. oxydans* y *G. frateurii*, descritos por (Ruiz et al. 2000). El patrón T2 (aislado A50 y A140) es el mismo que se informa para *A. tropicalis* y *A. orientalis* (González et al., 2006a) y tiene una pequeña diferencia de pb en una de las bandas con respecto al patrón descrito para esta especie por Barata et al. (2012). El morfotipo T3 (aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210) coincide con el patrón descrito por González (2006a) para *A. pomorum* y *A. pasteurianus* LMG 1262 y difiere en 25 y 40 pb en las bandas de 375 y 370 pb, respectivamente, con las informadas para la última especie por Ruiz et al. (2000); como estos autores utilizaron los mismos cebadores, esta pequeña diferencia puede deberse a la metodología utilizada en la corrida electroforética, ya que la concentración de agarosa como los tiempos de corrida pueden influir. El morfotipo T4 (aislado C9) coincide con el patrón de restricción descrito por González para *A. syzygii* (2006a); según este mismo autor, ésta enzima y la *AluI* serían suficientes para la identificación de ésta especie. En las Figuras 5.17 y 5.18 se observan los patrones de restricción obtenidos para las BAA.

Tabla 5.11 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *TaqI* para las BAA.

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
T1	C1 - C7 - C8 - A80 - A160 - A180	350-190-175-160-120-110-90
T2	A50 - A140	650-375-210-180
T3	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A70 - A210	500-375-370-210-70
T4	C9	500-375-210-175-160

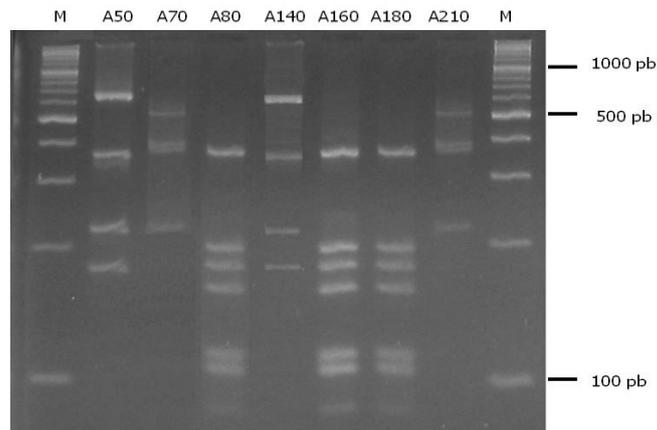


Figura 5.17 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *TaqI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

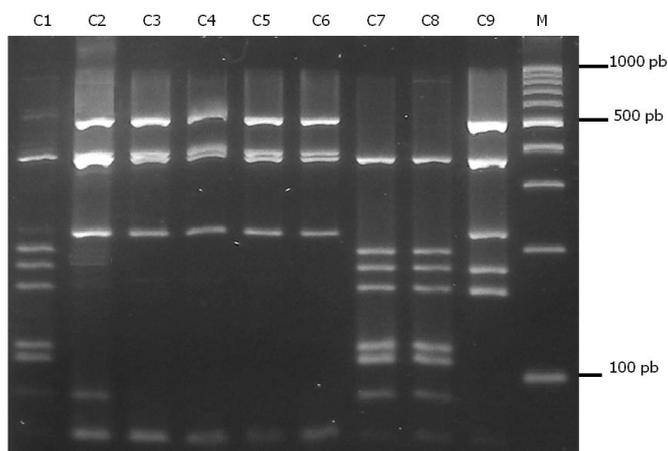


Figura 5.18 Patrones de PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *TaqI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

5.3.3.7 ENZIMA *CfoI* PARA EL GEN RIBOSOMAL 16S

El corte con la enzima *CfoI* produjo 4 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.12). Los aislados A50 y A140 presentaron un patrón similar al que presenta *A. tropicalis*, *A. indonesiensis*, *A. cerevisiae*, *A. orleanensis* y *A. malorum* (González et al. 2006a), solo hay 50 pb de diferencia en una de las bandas del patrón. Según este mismo autor, esta enzima puede diferenciar las bacterias *G. cerinus*, *G. frateurii* y *G. oxidans*, ya que éstas presentan distintos patrones de restricción con *CfoI*, por lo que los aislados A80, A160, A180, C1, C7 y C8 se identificaron como *G. frateurii*. El patrón generado por el aislado C9 coincide con el encontrado para *Acetobacter syzygii* por otros autores (Barata et al. 2012). Las Figuras 5.19 y 5.20 muestran los patrones de restricción generados con la enzima *CfoI* en las BAA.

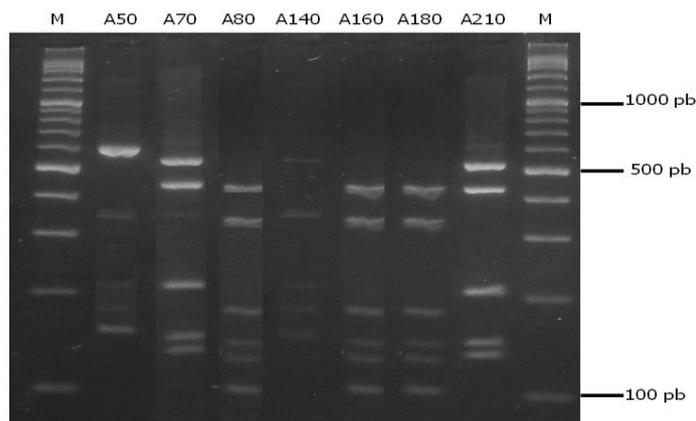


Figura 5.19 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de arándanos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *CfoI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

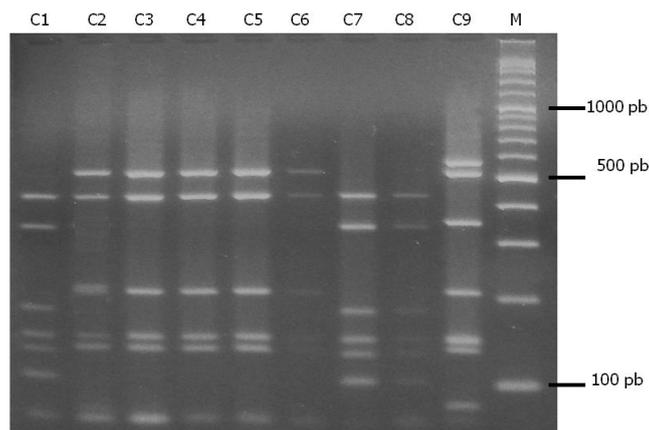


Figura 5.20 Perfiles PCR-RFLP de bacterias aisladas de frutas cítricas obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima de restricción *CfoI*. Corrida electroforética 3,5% agarosa y 0,5 µg/mL bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (100 pb).

Tabla 5.12 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S con la enzima *CfoI* para las BAA

Morfotipo	Aislados	Pares de bases
CF1	C1 - C7 - C8 - A80 - A160 - A180	430-340-180-160-140-110
CF2	A50 - A140	550-350-210-180-150
CF3	C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A70 - A210	520-420-210-150-140-70
CF4	C9	525-350-210-150-140-90

5.3.4 ANÁLISIS PCR-RFLP 16S ADN

La identificación tradicionalmente se ha realizado mediante el estudio fisiológico y propiedades quimiotaxonómicas (Buchanan y Gibbons 1984), pero estos métodos no son completamente fiables y requieren mucho tiempo. La técnica PCR-RFLP del 16S ADNr ha sido utilizada como método rutinario para identificar BAA aisladas de vinos y de frutas y para caracterizar las cepas de referencia (Poblet et al. 2000; Ruiz et al., 2000; Gonzalez et al. 2004; Prieto et

al. 2007; Vegas Pérez, 2011; Barata et al. 2012; Navarro et al. 2013). En este estudio se la empleó para identificar BAA aisladas de frutas regionales: arándanos y frutas cítricas.

Cuando no se tienen los patrones de bandas reportados previamente o cuando se encuentran pequeñas diferencias con los publicados por otros grupos de investigación, se puede realizar un corte virtual (RFLP virtual) como una posible solución (Raspor et al. 2007). Sin embargo, cuando se realiza el análisis virtual, al no saber o no tener una idea de la especie a identificar, es muy difícil encontrar el patrón que corresponde al aislado estudiado, debido al gran número de cepas de BAA que se pueden encontrar en el banco de datos (GenBank). Asimismo, se debe tener en cuenta, el uso de cebadores diferentes a los utilizados en las secuenciación de las cepas publicadas en el GenBank, o errores puntuales en la secuencias publicadas, que implican la aparición o desaparición de lugares de restricción de las enzimas (Blasco Escrivá 2009). Además, si el patrón generado con ciertas enzimas es el mismo para algunas especies, es necesario utilizar otras endonucleasas que generen patrones de polimorfismo diferentes para cada especie.

En el presente trabajo, los tratamientos con las enzimas de restricción *AluI* y *TaqI* y *CfoI* mostraron mayor cantidad de patrones de restricción, 4. *HaeIII* presentó 3 patrones, y las enzimas *RsaI*, *MspI* y *Tru9I* sólo dos patrones de restricción (Tabla 5.13).

Los aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180 se identificaron por el patrón que presentaron para la enzima *CfoI*, ya que esta enzima presenta patrones diferentes para *G. cerinus*, *G. frateurii*, *G. oxidans* y *G. asai* y éstas tienen patrones iguales con las otras enzimas ensayadas (*RsaI*, *MspI*, *TaqI*, *AluI*, *HaeIII*). En este caso, el patrón CF1 correspondientes a dichos aislados coincidió con el de *G. frateurii*, lo que permitió identificarlos. Se realizó el corte virtual con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor de la secuencia parcial del 16S de *G. frateurii* NBRC 16669 ya que aún no ha sido publicado el patrón que genera la enzima *TruI* para ésta especie, y se constató que el

patrón de banda obtenido virtualmente se corresponde al patrón TR1 encontrado en el laboratorio.

Tabla 5.13 Clasificación de BAA aisladas de acuerdo al análisis de PCR-RFLP 16S ADN y PCR-RFLP del ITS 16S-23S

	RFLP 16S ADN						RFLP ITS 16S-23S ADN				
	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>	<i>Tru9I</i>	<i>HaeIII</i>	<i>AluI</i>	<i>TaqI</i>	<i>CfoI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>TaqI</i>
A80	R1	M1	TR1	H1	A1	T1	CF1	ITS M1	ITS R1	ITS H1	ITS T1
A160	R1	M1	TR1	H1	A1	T1	CF1	ITS M1	ITS R1	ITS H1	ITS T1
A180	R1	M1	TR1	H1	A1	T1	CF1	ITS M1	ITS R1	ITS H1	ITS T1
C7	R1	M1	TR1	H1	A1	T1	CF1	ITS M1	ITS R1	ITS H1	ITS T1
C8	R1	M1	TR1	H1	A1	T1	CF1	ITS M1	ITS R1	ITS H1	ITS T1
C1	R1	M1	TR1	H3	A1	T1	CF1	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
A50	R2	M2	TR1	H2	A2	T2	CF2	ITS M3	ITS R2	ITS H2	ITS T2
A140	R2	M2	TR1	H2	A2	T2	CF2	ITS M3	ITS R2	ITS H2	ITS T2
A70	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
A210	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C2	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C3	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C4	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C5	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C6	R2	M2	TR2	H3	A3	T3	CF3	ITS M2	ITS R2	ITS H2	ITS T2
C9	R2	M2	TR2	H2	A4	T4	CF4	ITS M4	ITS R2	ITS H3	ITS T3

Si bien el aislado C1 se identificó como *G. frateurii*, cuando se comparó el perfil de restricción de éste aislado con la enzima *HaeIII* con los patrones de bandas informados por otros autores para BAA, se encontraron diferencias tanto en el número de bandas como en el tamaño de las mismas. También hubo diferencias respecto de los otros aislados de su grupo (identificados como *G. frateurii*) cuando se lo sometió a PCR-RFLP del ITS 16S-23S para las enzimas *RsaI*, *MspI*, *HaeIII* y *TaqI* (se discutirá en el apartado 5.3.3.9).

Los aislados A50 y A140 se identificaron por el patrón que presentaron frente al corte con la enzima *TaqI*, ya que las enzimas *RsaI*, *TruI*, *MspI*, *HaeIII* no fueron discriminatorias para las especies estudiadas. Las enzimas *AluI* y *CfoI* presentaron patrones comunes a varias especies de *Acetobacter*, por lo que no

fueron útiles por sí mismas para la identificación de éstos aislados; sin embargo, los resultados obtenidos con estas enzimas, junto al patrón de la *TaqI*, fueron necesarios para la identificación final de estos aislados. Estos aislados fueron identificados como *A. tropicalis*. Se realizaron cortes virtuales con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor para obtener los patrones de bandas con las enzimas *HaeIII*, *RsaI* y *MspI* para *A. tropicalis*, de esta manera se comprobó que los perfiles obtenidos en el laboratorio fueron iguales a los obtenidos virtualmente para ésta especie.

Las enzimas *RsaI*, *MspI*, y *TruI* no fueron discriminatorias para identificar los aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210, ya que los patrones de bandas observados son iguales para varias especies de *Acetobacter*. El patrón obtenido con la enzima *TaqI* permitió reducir a dos especies *A. pomorum* y *A. pasteurianus* y finalmente la enzima *AluI* permitió la identificación final ya que el patrón encontrado se corresponde sólo a *A. pasteurianus*. Para la enzima *HaeIII* y *CfoI* se hicieron cortes virtuales de las secuencias de *A. pasteurianus* LMG 1262 tomadas del GenBank y se confirmó que los patrones obtenidos virtualmente fueron iguales a los hallados en el presente trabajo.

El aislado A70 fue identificado por PCR-RFLP del gen16S como *A. pasteurianus*, sin embargo por pruebas bioquímicas (capítulo 3) fue identificado como *Gluconacetobacter*. Éste género tiene propiedades bioquímicas similares a *Acetobacter*, sólo difiere de ésta por la presencia de ubiquinona Q10 (Yamada y Yukphan 2008). Si se repasa la taxonomía de las BAA, se observa que este género primeramente fue un subgénero del género *Acetobacter*, en 1997 fue re-clasificado como un nuevo género por las diferencias en la secuencia parcial del 16S (Yamada et al. 1997), y más recientemente algunas especies de este género han sido clasificadas en un nuevo género *Komagataeibacter* (Yamada et al. 2012a; Yamada et al. 2012b). La técnica empleada en este estudio (capítulo 3) para determinar la presencia de ubiquinona fue muy compleja y posiblemente debido a una interpretación incorrecta se llegó a un resultado erróneo. Cuando se presentan estos problemas en los sistemas de identificación

fenotípicos, los métodos moleculares se establecen como procedimientos complementarios, alternativos o de referencia (Vílchez y Alonso 2009).

El aislado C9 fue identificado por los patrones que presentó frente al corte con las enzimas *AluI*, *TaqI* y *CfoI*, debido a que las otras enzimas ensayadas no permitieron una identificación porque sus patrones son comunes a varias especies de *Acetobacter*. El aislado C9 fue identificado como *A. syzygii*. González et al. (2006a) identificó la especie *A. syzygii* sólo con los patrones de corte obtenidos con *AluI* y *TaqI*, por ser ésta última la más discriminatoria para esta especie.

El estudio de PCR-RFLP del gen 16S realizado con las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*, permitió identificar las 16 BAA estudiadas mediante la comparación de los morfotipos generados con estas enzimas en los aislados con los informados por otros autores en cepas conocidas, y los obtenidos virtualmente con las secuencias parciales del ADNr 16S de las diferentes especies obtenidas del GenBank. Sin embargo, ésta técnica presenta dificultades cuando no se cuenta con cepas de referencia a las cuales se las pueda someter al corte con las mismas enzimas de restricción, ya que muchas veces los patrones de bandas obtenidos pueden diferir de los informados por otros autores por las diversas condiciones utilizadas (cebadores, concentración de agarosa, tiempo y voltaje de corrida electroforética, etc.), y porque no se han reportado todos los patrones de bandas con las distintas enzimas para todas las especies de BAA. Los aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210 fueron identificados como *A. pasteurianus*, los aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180 como *G. frateurii*, los aislados A50 y A140 como *A. tropicalis* y el aislado C9 como *A. syzygii*.

5.3.5 ANÁLISIS PCR- RFLP 16S-23S ADNr

Debido a que el análisis de PCR-RFLP del gen 16S ADNr es sobre una región muy conservada, cabe la posibilidad de que algunas especies lleguen a

tener una secuencia muy parecida, por lo que solo en algunos casos sería necesario el estudio de otra región para poder diferenciar especies. En estos casos se puede amplificar la región localizada entre el 16S y 23S y realizar posteriormente el corte enzimático. El elevado grado de diversidad observado en las ITS en diferentes géneros, diferentes especies, diferentes cepas y en una misma cepa, producido por variaciones en el número, tamaño y composición de las ITS del 16S-23S ARNr, constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y/o tipificación (Bou et al. 2011). La técnica PCR-RFLP del ITS 16S-23S tiene un mayor poder discriminatorio respecto del 16S ADNr debido a que presenta mayor polimorfismo (González y Mas 2011). Si bien esta técnica puede ser más resolutive que la PCR-RFLP 16S, en algunos casos puede dar más de un patrón para la misma especie y también puede dar patrones desconocidos para especies conocidas (Guillamón y Mas 2009). Ha sido utilizada por varios autores para diferenciar BAA (Ruiz et al. 2000; Poblet et al. 2000; Trcek y Teuber 2002; González 2005; Trcek 2005; Kretová y Grones 2005; Gullo et al. 2006; Vu et al. 2007; Kommanee et al. 2008; Tanasupawat et al. 2009; González y Mas 2011). El estudio de PCR-RFLP del espacio intergénico 16S -23S se realizó con siete enzimas: *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*.

Las enzimas de restricción *Tru9I*, *CfoI* y *AluI* utilizadas en esta investigación para el corte del producto de PCR del espaciador intergénico 16S-23S no permitieron diferenciar grupos, ya que todas las bacterias estudiadas generaron el mismo patrón de bandas. Siendo los mismos 600-150 para las enzimas *Tru9I* y *CfoI* y 350, 250 y 100 para la enzima *AluI*.

El tratamiento con la enzima *MspI* produjo 4 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.14). El patrón generado a partir los aislados C1, C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210 coincide con el informado por algunos autores para *A. pasteurianus* (Ruiz et al. 2000; Trcek y Teuber 2002; Kommanee et al. 2008), sin embargo difiere de los patrones de bandas informados por Tanasupawat et al. (2009) para la misma especie. El patrón que presentaron los aislados C7, C8, A80, A160 y A180 fue el mismo que Ruiz et al. (2000)

reportó para *G. frateurii* LMG 1365. Tanasupawat et al. (2009) reportó para *A. syzygii* NBRC 16604 un patrón de 500–200 pb con esta enzima, lo cual difiere del hallado en este estudio, ya que con *MspI* el aislado C9 presentó una única banda de 700 pb. El morfotipo ITS M3 no fue encontrado en la bibliografía, por tal motivo, sabiendo que dichos aislados habían sido identificado por PCR-RFLP como *A. tropicalis*, se realizó un corte virtual de la secuencia 16S-23S de la misma y se comprobó que tuvieron el mismo patrón.

Tabla 5.14 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima *MspI* para las BAA.

Morfotipo	Cepas	Pares de bases
ITS M1	C7 - C8 - A80 - A160 - A180	550-150
ITS M2	C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A70 - A210	440-320
ITS M3	A50 - A140	300-190-190
ITS M4	C9	700

El tratamiento con la enzima *HaeIII* del producto de PCR de la región ITS 16S-23S produjo 3 patrones de restricción en las bacterias estudiadas (Tabla 5.15). El patrón H2 generado a partir de los aislados C1, C2, C3, C4, C5, C6, A50, A70, A140 y A210 es el mismo informado en trabajos previos para *A. pasteurianus* (Trcek y Teuber 2002; Kommanee et al. 2008; Tanasupawat et al. 2009), el corte virtual de ésta especie para la secuencia ITS 16S-23S también confirmó el mismo patrón. El morfotipo ITS H4 generado por el aislado C9 es prácticamente coincidente con el encontrado por Tanasupawat et al. (2009) para *A. syzygii* NBRC 16604. Se observan sólo pequeñas diferencias de alrededor de 20pb, las cuales podrían ser atribuibles a que dichos autores utilizaron otras condiciones en su estudio (las enzimas utilizadas fueron de la marca New England BioLabs, y se emplearon primers y condiciones de electroforesis diferentes). Es indispensable realizar la técnica bajo las mismas condiciones a fin de comparar los patrones de bandas con los propios generados en el laboratorio con fines de identificación (Segura et al. 2010).

Tabla 5.15 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima *Hae*III para las BAA.

Morfotipo	Cepas	Pares de bases
ITS H1	C7 - C8 - A80 - A160 - A180	500-230
ITS H2	C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A50 - A70 - A140 - A210	480-310
ITS H3	C9	480-290

El corte con la enzima *Taq*I produjo 3 patrones de restricción en las cepas estudiadas (Tabla 5.16). El patrón generado a partir de los aislados C1, C2, C3, C4, C5, C6, A210 coincide con el patrón informado para *A. pasteurianus* LMG 1262 (Ruiz et al. 2000). El morfotipo ITS T1 generado por C7, C8, A70, A160 y A180 coincide, con pequeñas diferencias atribuibles a los distintos iniciadores utilizados, con los patrones encontrados por Thi Lan Houg et al. (2007) para *G. frateurii* NBRC 3264. El aislado C9 presentó un patrón único y diferente a los demás aislados. Como Tanasupawat et al. (2009) no utilizó esta enzima para su estudio en bacterias identificadas como *Acetobacter*, no tenemos el patrón de bandas para *A. syzygii*, para comparar con el patrón de bandas obtenido para C9.

Tabla 5.16 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima *Taq*I para las BAA.

Morfotipo	Cepas	Pares de bases
ITS T1	C7 - C8 - A80 - A160 - A180	410-290
ITS T2	C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - A50 - A70 - A140 - A210	400-380
ITS T3	C9	375-325

El corte con la enzima *Rsa*I fue poco discriminatorio ya que sólo produjo 1 patrón de restricción en las cepas C7, C8, A80, A160 y A180 (Tabla 5.17). Este patrón no coincide con el resultado informado por Ruiz et al. (2000) para

G. frateurii LMG 1365. Es por eso que se realizó el corte virtual para la secuencia del ITS 16S-23S de *G. frateurii* NBRC 16669, encontrándose bandas de 465-117-95, las cuales se podría decir que son iguales a las halladas en este estudio, ya que pequeñas diferencias en los pares de bases puede deberse a los cebadores diferentes. Las demás bacterias estudiadas no cortaron con esta enzima. Ésta enzima no reconoció ningún sitio de corte para los aislados C1, C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210, lo cual coincide con lo informado por Ruiz et al. (2000) para *A. pasteurianus* LMG 1262.

Tabla 5.17 Morfotipos obtenidos tras digestión del gen 16S–23S con la enzima *RsaI* para las BAA.

Morfotipo	Cepas	Pares de bases
ITS R1	C7 - C8 - A80 - A160 - A180	500-120-100
ITS R2	C1 - C2 - C3 - C4 - C5 - C6 - C9 - A50 - A70 - A140 - A210	750

La mayor parte de los cortes enzimáticos de los productos de PCR del espaciador intergénico 16S-23S confirmaron los resultados obtenidos mediante el análisis PCR-RFLP 16S, sin embargo no fue así para el aislado C1. Éste presentó patrones de restricción para las enzimas *MspI*, *HaeIII*, *TaqI* y *MspI* que no se corresponden a la identificación realizada con PCR-RFLP del 16S, ya que con dicha técnica se lo identificó como *G. frateurii*, sin embargo los tratamientos con estas enzimas para el ITS 16S-23S mostraron que el aislado C1 tienen el mismo patrón que *A. pasteurianus* (Tablas 5.13, 5.14, 5.15, 5.16 y 5.17). Los resultados obtenidos para éste prueban que la técnica PCR-RFLP del ITS 16S-23S tiene un mayor poder discriminatorio respecto del 16S ADNr debido a que presenta mayor polimorfismo (González y Mas 2011), lo que permitió que el aislado sea identificado como *A. pasteurianus* (resultado confirmado posteriormente mediante secuenciación, apartado 5.3.3.11.).

Como hasta la fecha no se ha depositado en la base de datos del GenBank la secuencia de bases de la región intergénica 16S-23S para *A. syzygii*, no se pudo realizar el corte virtual de la misma para comparar con los resultados obtenidos en el presente trabajo, sobre todo para los patrones que aún no han sido publicados. El análisis de restricción realizado con las enzimas utilizadas aportan información nueva para esta especie, ya que en la bibliografía consultada sólo se encontró el corte de *A. syzygii* con las enzimas *HaeIII* y *MspI*, los cuales coinciden con los hallados en este estudio, teniendo en cuenta que dichos autores utilizaron otras condiciones en el estudio (las enzimas utilizadas fueron de la marca New England BioLabs, se utilizaron otros primers y las condiciones de electroforesis fueron diferentes) (Tanasupawat et al. 2009).

5.3.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Mediante el análisis de PCR-RFLP del gen 16S se lograron identificar, entre las bacterias estudiadas y cepas de referencia, un total de 146 bandas diferentes con las distintas enzimas de restricción ensayadas (*AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*). A cada banda se le asignó su correspondiente peso molecular para construir una matriz binaria, de acuerdo a la presencia o ausencia (1 y 0) de cada banda para las distintas bacterias estudiadas y cepas de referencia. Posteriormente utilizando el programa InfoStat/L versión 2014 (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. 2014), se realizó un agrupamiento UPGMA con las siete enzimas empleando el coeficiente de similitud Dice.

En la Figura 5.21 se observa el dendograma formado a partir del análisis RFLP del gen ribosomal 16S. Se muestra de manera gráfica la distancia que representa cada aislamiento y los grupos formados por ellos de acuerdo a su similitud genética, así como las relaciones entre las bacterias estudiadas y las cepas de referencias. El dendograma generado con los patrones de restricción

no se considera una representación filogenética de las relaciones entre cepas, sino como una forma práctica de visualizar el grado de relación entre cepas e identificar grupos.

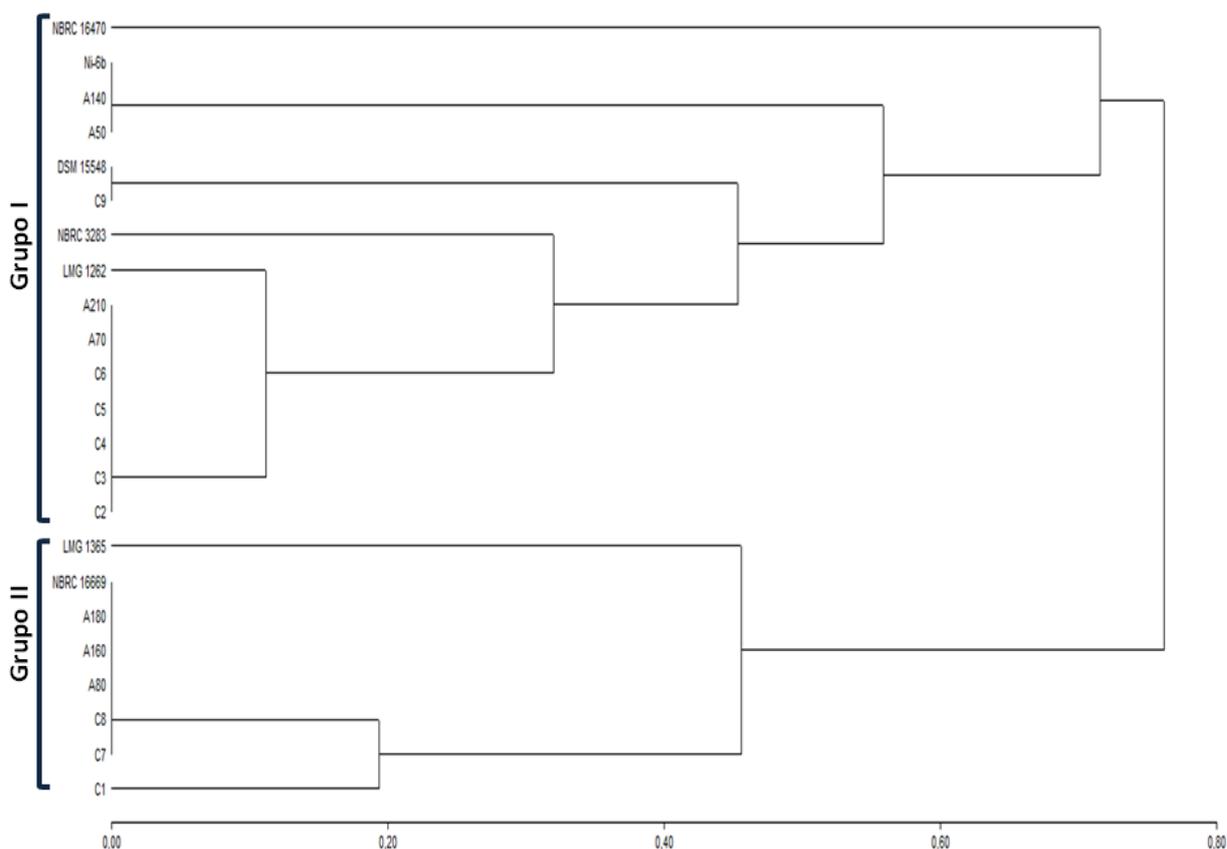


Figura 5.21 Dendrograma de similitud de bacterias aisladas y cepas de referencia respecto de patrones de restricción del gen ribosomal 16S con las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*. El dendrograma fue realizado con el programa InfoStat/L versión 2014 mediante agrupamiento UPGMA y coeficiente de similitud Dice.

Los resultados obtenidos muestran que se han formado dos grupos diferentes (I y II). En el grupo I, que se formó con un coeficiente de distancia de 0,75 respecto del grupo II, están los aislados identificados dentro del género *Acetobacter*. Los aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70, A210 tienen un coeficiente

de distancia de 0,00, es decir que el coeficiente de similitud es 1,00 (son iguales) y tienen una distancia de 0,10 respecto de la cepa de referencia LMG 1262 (*A. pasteurianus*). El aislado C9 tiene un coeficiente de distancia de 0,00 respecto de la cepa de referencia DSM 15548 (*A. syzygii*) y se formó con 0,45 de distancia respecto del grupo de *A. pasteurianus*, por otra parte los aislados A50 y A140 tienen una distancia de 0,00 respecto de Ni-6b (*A. tropicalis*) y se formaron con una distancia de 0,55 respecto de las otras especies de *Acetobacter*. La cepa de referencia NBRC 16470 (*A. tropicalis*) quedó más alejada en el dendograma.

El grupo II se formó con un coeficiente de distancia de 0,44, en éste se agruparon las bacterias identificadas dentro del género *Gluconobacter*. Los aislados C7, C8, A80, A160, A180 y la cepa de referencia NBRC 16669 tienen un coeficiente de distancia de 0,00, por lo que su coeficiente de semejanza es de 1,00. El aislado C1 está estrechamente relacionado con los aislados mencionados anteriormente, su coeficiente de distancia es de 0,20.

La construcción de árboles filogenéticos utilizando las secuencias parciales del gen ribosomal 16S es una herramienta útil para llevar a cabo estudios filogenéticos y actualmente es muy utilizada (Haruta et al. 2006; Andrés-Barrao et al. 2013; Fu et al. 2013; Mateo et al. 2014; Yamada 2014; Valera et al. 2015; Haghshenas et al. 2015). Sin embargo, el dendograma construido a partir de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del gen ribosomal 16S, nos permite observar como se relacionan y agrupan entre sí de acuerdo al grado de similitud y brinda una idea aproximada de las distancias entre las distintas bacterias estudiadas y las cepas de referencia. Varios autores han utilizado esta herramienta (Rodríguez et al. 2003; Pérez castañeda 2005; Chagas Junior et al. 2009; Górriz 2012; Zheng et al. 2014; Canales et al. 2014). De la misma manera, se puede construir dendogramas a partir del análisis de los caracteres fenotípicos y/o metabólicos obtenidos a partir de pruebas bioquímicas y fisiológicas (Wu et al. 2012).

5.3.7 SECUENCIACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL 16S

Para confirmar los resultados obtenidos con la técnica PCR-RFLP se realizó la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S. Las secuencias fueron editadas con el programa MEGA versión 6 (se eliminaron los sitios ambiguos) y se introdujeron en la base de datos online de acceso libre (GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), con el objetivo de identificar los aislados mediante la comparación con las otras secuencias depositadas en esta base; la cual presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes, y tipo y número de secuencias depositadas (Bou et al. 2011). La comparación se realizó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias.

La comparación de las secuencias de los aislados con otras disponibles en la base de datos proporcionó un informe (Tabla 5.18) constituido por un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia o similitud), además, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o “*query cover*” frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el porcentaje de bases idénticas.

Las secuencias con mayor grado de similitud han permitido asignar género y especie a cada aislado. Se pudo observar que para una misma especie se encuentra en la base de datos diferentes secuencias que presentaron un grado de disimilitud muy elevado en función del score (dato no mostrado).

Como se observa en la Tabla 5.18 los resultados de la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S de los aislados estudiados mostraron consistencia, como era esperado, con la identificación realizada por PCR-RFLP. Particularmente, la secuenciación del aislado C1 permitió clarificar la ambigüedad de los resultados obtenidos por PCR-RFLP del ITS 16S-23S y del gen 16S, confirmando que el mismo es *A. pasteurianus* con un 98% de

identidad, lo que se corresponde con los resultados obtenidos del corte con enzimas de restricción del espacio intergénico 16S-23S.

Tabla 5.18 BAA identificadas por secuenciación parcial del 16S utilizando el programa BLAST del NCBI.

Aislado	Identificación	Valor E	A (%)	I (%)
A50	<i>A. tropicalis</i> NBRC 16470	0,0	99	99
	<i>A. tropicalis</i> Ni-6b	0,0	99	99
A70	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	98	98
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	98	98
A80	<i>G. frateurii</i> LMG 1365	0,0	99	98
	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271	0,0	99	98
	<i>G. frateurii</i> LMG 3264	0,0	99	98
A140	<i>A. tropicalis</i> NBRC 16470	0,0	97	89
	<i>A. tropicalis</i> Ni-6b	0,0	97	89
A160	<i>G. frateurii</i> LMG 1365	0,0	99	99
	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271	0,0	99	99
	<i>G. frateurii</i> LMG 3264	0,0	99	99
A180	<i>G. frateurii</i> LMG 1365	0,0	99	99
	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271	0,0	99	99
	<i>G. frateurii</i> LMG 3264	0,0	99	99
A210	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	98	98
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	98	98

E, alineamientos por azar; A, alineamiento; I, identidad,

Como se observa en la Tabla 5.18 algunos aislados (A50, A160, A180, C3, C4, C5, C6 y C8) presentaron un porcentaje de identidad alto (99%) y su identificación coincide con las encontradas en la técnica PCR-RFLP. Los aislados A70, A80, A210, C1 y C7 presentaron un menor porcentaje de identidad (98%).

Tabla 5.18 (continuación) BAA identificadas por secuenciación parcial del 16S utilizando el programa BLAST del NCBI.

Aislado	Identificación	Valor E	A (%)	I (%)
C1	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	99	98
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	99	98
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	99	98
C2	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	94	88
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	94	88
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	94	88
C3	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	99	99
C4	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	99	99
C5	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	99	99
C6	<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262	0,0	99	99
	<i>A. pasteurianus</i> DSM 3509	0,0	99	99
C7	<i>G. frateurii</i> LMG 1365	0,0	99	98
	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271	0,0	99	98
	<i>G. frateurii</i> LMG 3264	0,0	99	98
C8	<i>G. frateurii</i> LMG 1365	0,0	99	99
	<i>G. japonicus</i> NBRC 3271	0,0	99	99
	<i>G. frateurii</i> LMG 3264	0,0	99	99
C9	<i>A. ghanensis</i> LMG 23848	0,0	97	98
	<i>A. lambici</i> LMG 27439	0,0	97	98
	<i>A. syzygii</i> NBRC 16604	0,0	97	98

E, alineamientos por azar; A, alineamiento; I, identidad,

Los aislados A140 y C2 presentaron un bajo porcentaje de identidad (89 y 88%, respectivamente), lo que puede explicarse, en parte porque dichas secuencias presentaron mayor número de bases ambiguas, lo que haría un

menor porcentaje de alineamiento con las secuencias de otras bacterias; sin embargo también se podría pensar que son nuevas especies aún no publicadas en el GenBank. En efecto, existen diferentes criterios en el porcentaje de similitud del ARNr 16S para la pertenencia o no a una misma especie, no obstante, definir la especie o el género a través de un valor para el ARNr 16S puede no ser apropiado para todos los géneros (Bou et al. 2011). Una actitud de consenso es aceptar que una similitud igual o mayor al 98,5% define una especie y tasas del 95 al 99% definen un género (Bou et al. 2011). Según las recomendaciones del Comité ad Doc para la validación de la definición de especie en Bacteriología, aislados de la misma especie deben presentar valores de homología del 16S ADN iguales o superiores al 97% (Stackebrandt et al. 2002). Teniendo en cuenta estas recomendaciones se puede decir que los aislados A140 y C2 podrían pertenecer a nuevas especies, de las cuales no se han publicado sus secuencias parciales y de allí el bajo porcentaje de identidad en relación con las especies conocidas. Sería necesario profundizar más en la investigación para confirmar sus identidades.

El aislado C9 fue identificado tanto por PCR-RFLP como por secuenciación como *A. syzygii*; no obstante, se observa el mismo porcentaje de alineamiento y de identidad con respecto a otras especies: *A. ghanensis* y *A. lambici*.

La figura 5.22 muestra el árbol filogenético construido en base a las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de los aislados y de las cepas de referencia, mediante el software MEGA versión 6 descrito por Tamura et al. (2013). Como ya se dijo anteriormente, las secuencias obtenidas con los aislados C2 y A140 presentaron muchas bases ambiguas, lo que redundó en un menor tamaño de la secuencia y un bajo porcentaje de identidad, por lo tanto se resolvió no incorporarlas para la construcción del árbol filogenético. Todos los aislados incluidos en el árbol presentaron filiación filogenética, en el mismo se observaron dos grupos y en cada punto de ramificación se indican los valores porcentuales de bootstrap sobre la base de 1000 repeticiones, siendo los mismos iguales o mayores al 55%.

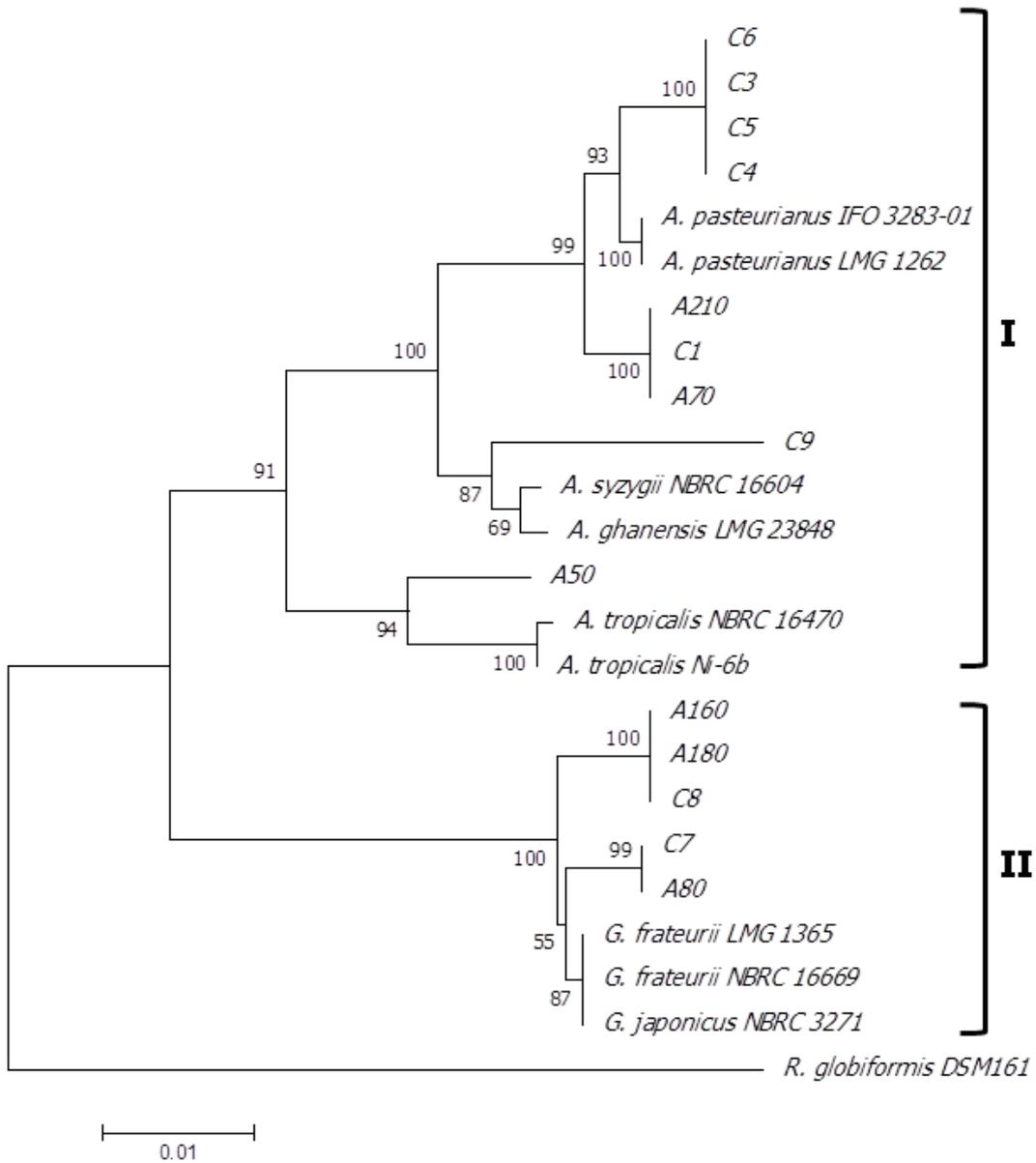


Figura 5.22 Relación filogenética de los aislados de BAA con cepas de referencia tomadas del GenBank. El árbol de distancias se ha construido en base a las secuencias parciales del 16S ADNr con el programa MEGA versión 6, utilizando el método Neighbor Joining. La distancia evolutiva fue calculada usando el método Maximum Composite Likelihood. La robustez de las ramas está indicada por los valores de "bootstrap" (%) calculado para 1000 repeticiones. Se utilizó la cepa *Rhodopila globiformis* DSM 161 como grupo externo.

El árbol resalta la variabilidad genética presente entre los aislamientos que fueron obtenidos a partir de arándanos y frutas cítricas, ya que muestra claramente dos grupos principales (grupo I y grupo II). En el grupo I se encuentran los aislados identificados dentro del género *Acetobacter* y delimitándose tres subgrupos. En el subgrupo uno, se encuentran todos los aislados identificados como *A. pasteurianus* (A70, A210, C1, C3, C4, C5, C6) y las cepas de referencia *A. pasteurianus* LMG 1262 y *A. pasteurianus* IFO3283-01; en el subgrupo dos se encuentra el aislado identificado como *A. syzygii* (C9) y las cepas de referencia *A. syzygii* NBRC 16604 y *A. ghanensis* LMG 23848; y en el subgrupo tres el aislado identificado como *A. tropicalis* (A50) y las cepas de referencias *A. tropicalis* NBRC 16470 y *A. tropicalis* Ni-6b. En el grupo II se encuentran los aislados identificados como *G. frateurii* (A80, A160, A180, C7 y C8) junto a las cepas patrones *G. frateurii* NBRC 16669, *G. frateurii* LMG 1365 y *G. japonicus* NBRC 3271.

5.4 CONCLUSIONES

Las técnicas utilizadas en este estudio han permitido la identificación a nivel de género y especie las 16 BAA estudiadas. El método de PCR-RFLP del gen 16S y el espacio intergénico 16S-23S resultaron técnicas accesibles, de fácil realización e interpretación, que ofrece un nivel de discriminación suficiente para la identificación. Sin embargo, presenta dificultades cuando no se cuenta con cepas de referencia a las cuales se pueda someter al corte con las mismas enzimas de restricción.

El estudio de PCR-RFLP del gen 16S realizado con las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *CfoI* y *Tru9I*, permitió identificar las BAA. Los aislados C2, C3, C4, C5, C6, A70 y A210 fueron identificados como *A. pasteurianus*, los aislados C1, C7, C8, A80, A160 y A180 como *G. frateurii*, los aislados A50 y A140 como *A. tropicalis* y el aislado C9 como *A. syzygii*.

La mayor parte de los cortes enzimáticos de los productos de PCR del espaciador intergénico 16S-23S confirmaron los resultados obtenidos mediante el análisis PCR-RFLP 16S; sin embargo, no fue así para el aislado C1. Éste presentó patrones diferentes (respecto de otros aislados identificados como *G. frateurii*) cuando se analizó los cortes de las ITS. Se demostró que la técnica PCR-RFLP del ITS 16S-23S tiene un mayor poder discriminatorio o resolutivo respecto del 16S ADNr debido a que presenta mayor polimorfismo, lo que permitió que el aislado C1 sea identificado como *A. pasteurianus*, resultado confirmado posteriormente mediante secuenciación del 16S.

El dendograma construido a partir de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del gen ribosomal 16S, permitió observar cómo se relacionan y agrupan los aislados entre sí de acuerdo al grado de similitud, dando, además una idea aproximada de las distancias entre las distintas bacterias estudiadas y las cepas de referencia.

La secuenciación del gen 16S realizada en los aislados confirmó los resultados encontrados en las técnicas de PCR-RFLP, permitiendo la identificación de todos los aislados.

5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M. y Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 25(7), 849–56.

- Andorra Solsona, I. (2010). Adaptation and development of culture-independent techniques for the identification and enumeration of microorganisms in wine fermentations. *Food Microbiology*, 25, 849–856.
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M. y Barja, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(2), 75–81.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 152–61.
- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 36(5), 307–314.
- Blasco Escrivá, L. (2009). *Aplicación de las técnicas Fish , PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación*. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.
- Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. (1984). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]*. (8nd Edition). Beijing: Beijing Science Publisher.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–24.

- Canales, P. E., Chávez-Hidalgo, E. L. y Zabaleta, A. I. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI(2), 150–157.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1647–52.
- Cleenwerck, I., De Wachter, M., González, A., De Vuyst, L. y De Vos, P. (2009). Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1771–86.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S. y Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, 23(8), 809–813.
- De Vero, L. y Giudici, P. (2008). Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 96–101.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P. y Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 79–90.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. (2014). InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

- Fernández Cuenca, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(6), 355–60.
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S. y Ruiz-Larrea, F. (2010). Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology*, 27(8), 973–8.
- Fu, L., Zhang, F. y Zhang, B. (2013). Isolation and identification of acetic acid bacteria. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 50(24), 114–119.
- Gammon, K. S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S. J., Chandra, S. y Middleton, A. M. (2007). Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 262–267.
- García-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L. y Cornelis, P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2281–92.
- González, A., Guillamón, J. M., Mas, A. y Poblet, M. (2006a). Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 141–6.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 295–304.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2006b). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 123–8.

- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A., y Guillamon, J. M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(4), 853–860.
- González, A. y Mas, A. (2011). Differentiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *International Journal of Food Microbiology*, *147*(3), 217–22.
- González, Á. (2005). *Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., Holland, S. y Zelazny, A. M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2609–16.
- Guillamón, J. M. y Mas, A. (2009). Acetic acid bacteria. In H. K. et al. (eds.) (Ed.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (Vol. 11, pp. 31 –46). Berlín: Springer-Verlag Heidelberg.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(2), 209–12.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. y Yari Khosroushahi, A. (2015). Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International Journal of Food Science y Technology*, *50*(4), 1056–1064.
- Hall, T. (2013). BioEdit Sequence Alignment Editor. Retrieved from <http://bioedit.software.informer.com/>
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M. y Igarashi, Y. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during

- a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 79–87.
- Hidalgo, C., Torija, M. J., Mas, A y Mateo, E. (2013a). Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 34(1), 88–94.
- Hidalgo, C., García, D., Romero, J., Mas, A., Torija, M. J. y Mateo, E. (2013b). *Acetobacter* strains isolated during the acetification of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) wine. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 227–232.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A. y Torija, M. J. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiology*, 30(1), 98–104.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J. y Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 245–9.
- Jara, C.I. (2009). *Desarrollo de métodos de Biología Molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre*. Tesis Doctoral. Departamet de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S. y Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2263–7.
- Kántor, A., Kačániová, M., Petrová, J., Medo, J., Hleba, L., Rovná, K. y Attila, M. (2014). Application of RT-PCR for *Acetobacter* species detection in red wine. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(1), 231–234.
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., Kim, H. S., Choi, D., Hwang, D. G. y Seo, K. H. (2015). Detection and enumeration of lactic acid bacteria, acetic acid

- bacteria and yeast in kefir grain and milk using quantitative Real-Time PCR. *Journal of Food Safety*, 35(1), 102–107.
- Kommanee, J., Akaracharanya, A., Tanasupawat, S. y Malimas, T. (2008). Identification of *Acetobacter* strains isolated in Thailand based on 16S-23S rRNA gene ITS restriction and 16S rRNA gene sequence analysis. *Annals of Microbiology*, 58(2), 319–324.
- Kretová, M. y Grones, J. (2005). Molecular Analysis of 16S-23S Spacer Regions of *Acetobacter* Species. *Folia Microbiology*, 50(4), 288–292.
- Li, L., Wieme, A., Spitaels, F., Balzarini, T., Nunes, O. C. y Célia, M. (2014). *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir and identification of *Acetobacter* species by dnaK, groEL and rpoB sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7), 2407–2415.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(3), 119–131.
- Loganathan, P. y Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1185–90.
- Lopez, I., Ruiz-larrea, F., Cocolin, L., Phister, T., Marshall, M., Vandergheynst, J., Mills, D. y Orr, E. (2003). Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6801–6807.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2007). *Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -

- Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 301–307.
- Mamlouk, D., Hidalgo, C., Torija, M.-J. y Gullo, M. (2011). Evaluation and optimisation of bacterial genomic DNA extraction for no-culture techniques applied to vinegars. *Food Microbiology*, 28(7), 1374–9.
- Mandigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). *Brock, Biología de Los Microorganismos*. (P. Hall, Ed.) (12ª Edición). Madrid, España.
- Mateo, E., Torija, M. J., Mas, A. y Bartowsky, E. J. (2014). Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 98–106.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. y Murooka, Y. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 986–990.
- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M., y Mas, A. (2013). Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s), 19–23.
- Pérez castañeda, L. M. (2005). *Variabilidad genética de cepas nativas de Azospirillum brasilense mediante análisis tipo PCR-RFLP del DNA 16S ribosomal*. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Tamaulipas, México.
- Poblet, M., Rozes, N., Guillamón, J. M., y Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 63–67.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A. y Romero, J. (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 348–55.

- Raspor, P., Zupan, J. y Čadež, N. (2007). Validation of yeast identification by in silico RFLP. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15(3), 267–281.
- Rodríguez, M., Hernández, I., Coto, O., Canales, E. y Cornide, M. T. (2003). RFLP and AFLP polymorphism analysis in sugarcane varieties. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 34(3), 121–128.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1981–1987.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Segura, L. E., Kirchmayr, M. R., Flores, E. P. y Gschaedler, Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *E-Gnosis (online)*, 8, 1–12.
- Sharafi, S., Rasooli, I. y Behesthti-Maal, K. (2010). Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 38–45.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. D, Kampfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Swings, J., Roselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. y Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043–1047.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Biology and Evolution*: 30 2725-2729.

- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Malimas, T., Yukphan, P., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2009). Identification of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Asaia* strains isolated in Thailand based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer restriction and 16S rRNA gene sequence analyses. *Microbes and Environments*, 24(2), 135–143.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O. y Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 159–167.
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiology*, 27, 257–265.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9º Edición). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.C.F.
- Trcek, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 8, 735-745.
- Trček, J., Jernejc, K. y Matsushita, K. (2007). The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles*, 11, 627–635.
- Trcek, J. y Teuber, M. (2002). Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 208, 69–75.
- Valera, M. J., Laich, F., González, S. S., Torija, M. J., Mateo, E. y Mas, A. (2011). Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 105–112.

- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A. y Mateo, E. (2013). *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and quantification by Real-Time PCR with TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology*, 36(1), 30–39.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A. y Mateo, E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 46, 452–462.
- Vegas, C., González, Á., Mateo, E., Mas, A., Poblet, M. y Torija, M. J. (2013). Evaluation of representativity of the acetic acid bacteria species identified by culture-dependent method during a traditional wine vinegar production. *Food Research International*, 51, 404–411.
- Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J. M., Poblet, M., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 130–136.
- Vegas, C. A. (2011). *Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili.
- Vílchez, G. y Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos Scope and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 6–12.

CAPÍTULO N° 6

***LIOFILIZACIÓN Y CONGELACIÓN:
ALTERNATIVAS PARA CONSERVAR
LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO***

6.1 INTRODUCCIÓN

6.1.1 CULTIVOS MICROBIANOS

Un cultivo starter se define como una colección de células microbianas que son capaces de iniciar y completar un proceso de fermentación en forma rápida (Ndoye et al. 2009). Los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores en aplicaciones industriales o biotecnológicas, tales como las bacterias del ácido láctico y las levaduras, por lo general se conservan por congelación, liofilización o secado spray (Ndoye et al. 2009). En los dos últimos casos se comercializan "en polvo". Sin embargo, no se dispone comercialmente de un cultivo iniciador de BAA conservados en esas condiciones, que permita una fermentación controlada y la obtención de un vinagre con características particulares.

Actualmente se utilizan preparaciones líquidas (madre del vinagre). El inconveniente de las mismas con respecto a los cultivos deshidratados (liofilizados) es que estos últimos pueden ser transportados y manipulados más fácilmente, y por otra parte tienen mayor estabilidad en conservación a largo plazo (De Vuyst 2000).

6.1.2 CONSERVACIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS

La conservación de cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales donde éstos tienen un rol activo (producción de alimentos, de productos farmacéuticos, etc.) (De Vero y Giudici 2013). No sólo se requiere la viabilidad de las cepas altamente productivas durante largos periodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, sino que también se debe asegurar el mantenimiento de sus actividades metabólicas, especialmente las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés para los procesos biotecnológicos donde

éstas participan (Hasegawa 1996). Los bancos de microorganismos, además de ser útiles con fines de investigación, aplicaciones biotecnológicas, o de enseñanza, pueden ser beneficiosos para mantener los microorganismos aislados en trabajos científicos para su utilización en estudios adicionales. Pueden servir también como depósitos de cepas o como depósitos de patentes y pueden proveer de servicios de confidencialidad para almacenar los organismos claves para la investigación y la industria (Smith 2003).

Se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original. Sin embargo, no es posible utilizar un único método de conservación para todos los cultivos, sino que es necesario realizar estudios que permitan determinar cuál es el óptimo para cada microorganismo (Hasegawa 1996). La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por disminución en la disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (Nakamura 1996).

Al valorar los distintos métodos de conservación, también hay que evaluar los procedimientos utilizados para vivificar las células, como así también las técnicas para determinar las actividades metabólicas de las mismas. La disminución en la actividad celular no se produce de manera uniforme en todas las células y la tasa de supervivencia y el mantenimiento de la actividad no siempre se correlacionan (Smith 2013). Las cepas deben ser almacenadas en condiciones que favorezcan el mantenimiento de las actividades y las tasas de supervivencia (Smith 2013).

Los procedimientos de conservación a corto plazo (repiques periódicos) no son recomendables para las cepas de uso industrial, debido a los inconvenientes que pueden ocasionar estos métodos: contaminación, cambios genéticos y en las propiedades fisiológicas; además del costo económico para mantener los cultivos en estas condiciones (Gherna 2013).

Un cultivo de aplicación industrial tiene que reunir unas determinadas características: contener el máximo número de células viables, estar libres de contaminantes y ser activo en las condiciones de procesamiento (Nakamura 1996). Los métodos de conservación de microorganismos a largo plazo (congelación, ultra congelación y liofilización) permiten preservar las características fenotípicas y genotípicas de cepas destinadas a usos biotecnológicos (Tortora et al. 2007; Gullo et al. 2012). Estos métodos mejoran la estabilidad de las bacterias (Gullo et al. 2012), sin embargo, hay estudios que demuestran que las BAA pueden tener cambios fenotípicos, principalmente, se puede modificar la propiedad de oxidar el etanol a ácido acético y la resistencia al ácido acético (Ohmori et al. 1982). Estos cambios, post tratamiento de conservación han sido poco estudiados (Nomura et al. 1998). Hay sólo unos pocos informes en la literatura que describen cómo mantener mejor las actividades de microorganismos útiles mientras están en el almacenamiento a largo plazo: la escasez de este tipo de informes se debe al hecho de que la investigación se produce en las empresas privadas y se conservan los datos resultantes como secretos comerciales (Hasegawa 1996).

6.1.3 CONSERVACIÓN DE BAA

La conservación de BAA tiene por objetivo principal mantenerlas en estado viable, sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos. Sin embargo, en estas bacterias se ha observado inestabilidad genética, que frecuentemente causa mutaciones espontáneas y conducen a deficiencias en varias propiedades fisiológicas, tales como la resistencia al ácido acético y la oxidación del etanol (Ohmori et al. 1982). A pesar de que la inestabilidad genética de las BAA no ha sido suficientemente estudiada todavía, tiene una influencia significativa en uso industrial de estos microorganismos (De Vero y Giudici 2013). Debido a la existencia de BAA hipermutables presentes en la naturaleza (Azuma et al. 2009) no es recomendable realizar repiques periódicos para el mantenimiento de éstas, ya que esta técnica implica transferencia frecuente de las bacterias a un

medio con nutrientes frescos, y con esto pueden aparecer pérdidas de propiedades durante el almacenamiento a largo plazo (Smith 2013). Por esto es recomendado conservar las BAA mediante otros métodos como la liofilización o criopreservación (De Vero y Giudici 2013).

6.1.3.1 CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un método muy utilizado para conservar microorganismos. Consiste en el congelamiento del producto (cultivo bacteriano) y posterior sublimación, lo cual se logra aplicando vacío (Gherna 2013). De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Esta tecnología se ha aplicado a muchos microorganismos de uso industrial, tales como bacterias lácticas y levaduras comercializadas como starters (Ziadi et al. 2005; Reddy et al. 2009; Carvalho et al. 2004; Zhao y Zhang 2005; Santivarangkna et al. 2008; De Giulio et al. 2005; Selwal et al. 2011); mientras que la conservación de la BAA mediante esta tecnología todavía está en desarrollo (Ndoye et al. 2009), ya que sólo se reportan algunos trabajos de Sokollek y colaboradores, quienes liofilizaron una especie de BAA aislada de vinagres, identificada como *A. europaeus* (hoy re-clasificada como *Ko. europaeus*) utilizando 20% de extracto de malta como lioprotector (Sokollek y Hammes 1997; Sokollek et al. 1998), Schuller et al. (2000) utilizaron esta metodología para *Ga. entanii* (hoy re-clasificada como *Ko. entanii*) y más recientemente se ha utilizado para liofilizar BAA termorresistentes aisladas de mango y cereales de África con manitol al 20% como protector (Ndoye et al., 2007). El manual de Bergey's en su 2º edición menciona que cultivos de los géneros *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* pueden ser conservados mediante liofilización (Sievers y Swings 2005).

Si bien la liofilización es un método muy utilizado para conservar microorganismos, algunas bacterias son sensibles a esta técnica; los niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas a este

proceso, e incluso su mantenimiento prolongado hace que la viabilidad celular disminuya aún más (Hasegawa 1996). Como ventajas podemos citar que se conservan en pequeñas ampollas que se pueden almacenar en espacios reducidos, no requiere condiciones especiales durante el almacenamiento y se evita transporte en frío durante el envío del producto (Nakamura 1996; De Vero y Giudici 2013). Sin embargo, el proceso de liofilización expone las células a cierto stress y los niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas a este proceso, y más aún durante un almacenamiento prolongado (Papavasiliou et al. 2008).

La viabilidad de la célula microbiana y la eficacia del proceso de liofilización dependen de muchos factores; por ejemplo un cultivo en fase de crecimiento estacionario, donde los nutrientes se agotan, desencadena respuestas al stress para permitir la supervivencia de la población celular, esta misma respuesta, protege a la célula de otras condiciones adversas como la desecación y temperaturas extremas (Morgan et al. 2006). Otros factores que pueden influir son: el lioprotector usado, la temperatura de congelación y las condiciones de rehidratación (Hubálek 2003). Un buen medio debería proporcionar crioprotección a las células durante el proceso, estabilidad durante el almacenamiento y permitir una fácil hidratación (Navarta et al. 2011). Sustancias tales como polímeros, azúcares (sacarosa, trehalosa, rafinosa), leche descremada y polioles (glicerol, manitol, inositol) han sido probados en distintas concentraciones para evaluar su efecto protector sobre la viabilidad de bacterias (Zhao y Zhang 2005; De Vero y Giudici 2013). No obstante, la protección otorgada durante estos procesos varía con las especies microbianas (Hubálek 2003). Las disoluciones lioprotectoras son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización o de almacenamiento, aunque en la mayoría de los casos, los mecanismos del efecto protector son poco conocidos (Burguet-Lago et al. 2012).

6.1.3.2 CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

La congelación es un método físico-químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos. En éste proceso, el agua presente, cambia su estado de líquido a sólido y las bacterias deben adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione algún daño (Sánchez Leal y Corrales Ramirez 2005). Las BAA han sido conservadas por congelación utilizando 20% de extracto de malta y manteniéndolas en nitrógeno líquido (Sokollek et al. 1998) y utilizando glicerol en distintas concentraciones (Wiegand y Klemm 2006; Lefeber et al. 2010; Gullo et al. 2012;).

Las sustancias denominadas crioprotectores impiden la acción destructiva de la congelación sobre las células. Estas sustancias atrapan el agua en el interior celular, lo que impide que se formen cristales geométricos que podrían romper la membrana citoplasmática de las bacterias (Hubálek 2003; Sánchez Leal y Corrales Ramirez, 2005). Los crioprotectores más utilizados son: sustancias no ionizables de bajo peso molecular que provocan solidificación amorfa y vítrea en lugar de cristalización (glicerol, sacarosa, lactosa, dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros), sustancias ricas en proteínas como la leche descremada, suero, extracto de carne, extracto de malta y proteínas purificadas como la albúmina (Hubálek 2003).

La resistencia de las bacterias a la congelación depende de las condiciones de congelación. A bajas velocidades de congelación, se produce una acumulación de hielo extracelular, lo cual provoca altas concentraciones de electrolitos en el medio externo con la consiguiente deshidratación, esto induce daños en las células. A altas velocidades de congelación, las células son dañadas por la formación de hielo intracelular (Gherna 2013). En ambos casos, el daño mecánico, ligado a la presencia de cristales de hielo, puede afectar a la estructura de la célula (Fonseca et al. 2001).

La actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura, por ello la congelación es una técnica utilizada para distintos períodos de conservación. Para aplicar esta técnica es necesario el crecimiento del cultivo hasta la fase estacionaria, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las que están en fase exponencial (Nakamura 1996; Morgan et al. 2006). Las células a congelar pueden ser resuspendidas directamente en un agente crioprotector, o se puede agregar el mismo como aditivo al medio de cultivo. El número de bacterias debe ser aproximadamente de 1×10^8 células/mL (Gherna 2013). El almacenamiento puede ser realizado a -20 °C, pero es preferible congelar a -70 °C en ultrafreezer, aunque también a ésta temperatura se produce cierta pérdida de viabilidad (Nakamura 1996). Además, se puede congelar en nitrógeno líquido a -196 °C y en nitrógeno en fase de vapor a -150 °C (De Vero y Giudici 2013).

La efectividad de la criopreservación puede ser afectada por varios factores: el tipo de microorganismo, la fase de crecimiento de los microorganismos (final de la fase exponencial y principio de la estacionaria), la composición del medio de cultivo utilizado en el crecimiento de los microorganismos, el pH, la concentración celular, la composición y contenido de lípidos de la célula, la velocidad de enfriamiento, el tipo y concentración del crioprotector y la temperatura y duración del almacenamiento (Hubálek 2003). Los agentes crioprotectores que pueden ser utilizados para minimizar el daño que ocurre durante la congelación no deben ser tóxicos a las células, deben penetrar fácilmente la membrana celular y se deben unir a las moléculas de agua para evitar la formación de cristales regulares. Los protectores más utilizados son glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) (Hasegawa 1996).

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

Las BAA utilizadas en los ensayos fueron seleccionadas en función de su capacidad para acetificar un mosto alcohólico (capítulo 2). Es por eso que se utilizaron los aislados C1, C4, C5, C6, A210 (todas ellas *A. pasteurianus*) y C9 (*A. syzygii*).

6.2.2 MEDIOS DE CULTIVOS, LIOPROTECTORES, CRIOPROTECTORES

Con cada una de las BAA estudiadas se procedió de la siguiente manera: fueron inoculadas en 5 mL de caldo GY (1% de glucosa, 1% extracto de levadura) y se incubaron en estufa Faeta (Argentina) durante 72 a 30 ± 1 °C. El cultivo activo (5 mL) se transfirió a un erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo GY, se incubó en estufa Faeta (Argentina) a 30 ± 1 °C en agitador orbital JP SELECTA modelo Rotabit, (España) a 200 rpm durante 72 horas. Finalizado el tiempo de incubación se hizo una observación microscópica del cultivo en fresco y por tinción de Gram en Microscopio Óptico Leica DME (Estados Unidos), para verificar la pureza del mismo.

Los crioprotectores utilizados para el proceso de congelación fueron glicerol al 20% (v/v) y manitol al 20% (p/v). Para la liofilización se usaron los lioprotectores: manitol al 20% y leche descremada en polvo al 10 % (p/v).

6.2.3 DESCRIPCIÓN DE LAS EXPERIENCIAS DE LABORATORIO

El cultivo bacteriano obtenido, fue fraccionado en 4 tubos cónicos y centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos en centrífuga Boeco modelo C-28

(Alemania). Los respectivos sedimentos, se lavaron dos veces con agua destilada estéril (Figura 6.1).

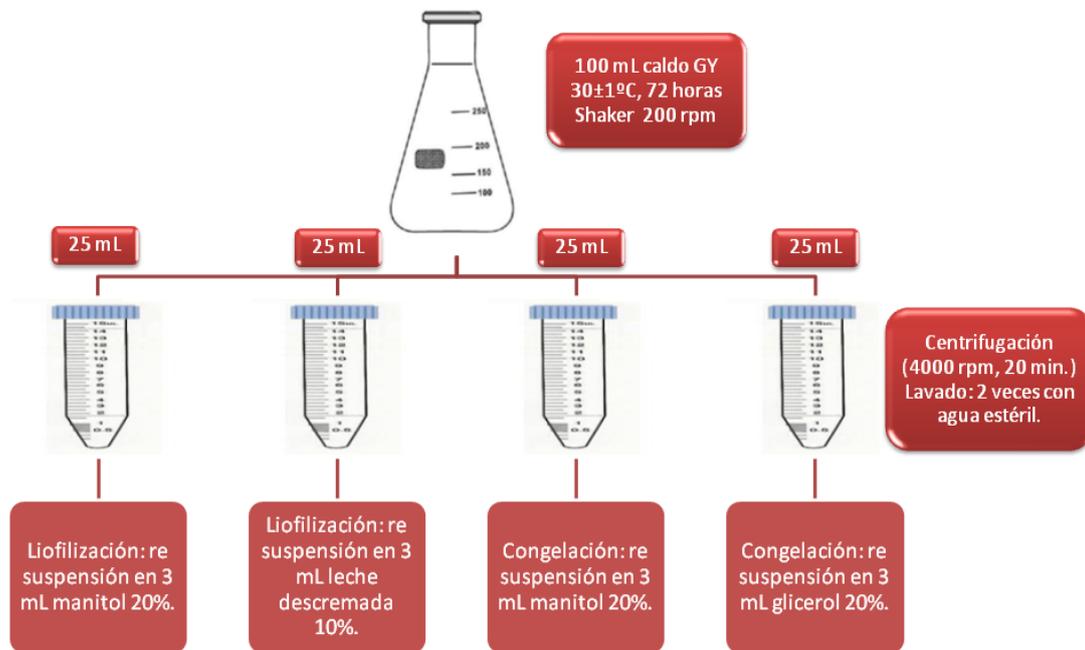


Figura 6.1 Esquema de los procesos de liofilización y congelación.

De los 4 tubos conteniendo células de BAA, se tomaron dos para llevar a cabo su conservación por liofilización y dos para conservarlos por congelación.

6.2.4 MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN

Las células bacterianas fueron re-suspendidas en 3,0 mL de las diferentes disoluciones lioprotectoras (leche descremada en polvo y manitol), y se homogeneizaron completamente. Posteriormente, se tomaron 200 µL de cada suspensión y se dispusieron en viales para su liofilización. Los viales fueron congelados durante 4 horas a -110 °C. A continuación fueron colocados

en liofilizador Heto Drywinner (Alemania) provisto de manifold y bomba de vacío Vakuumentchnik RZ2 (Alemania) que permite una generación de vacío de 100 mbar y temperatura de trabajo de -110 °C (Figura 6.2). El tiempo total de liofilización fue de 24 horas.



Figura 6.2 Equipo de liofilización Heto Drywinner provisto de manifold

6.2.4.1 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los microorganismos liófilos fueron almacenadas a dos temperaturas: 5 °C y a temperatura ambiente no controlada (se trató de simular condiciones de almacenamientos reales, donde no se controla la temperatura). Las pruebas de viabilidad se realizaron por duplicado al tiempo 0, 60 y 180 días.

6.2.4.2 CONTROL DE PUREZA Y VIABILIDAD

Las BAA liofilizadas fueron re-hidratadas, en el mismo vial donde fueron conservadas, con 200 µL de agua de peptona tamponada al 0,5% (Britania), se mezcló vigorosamente con agitador Velp Scientifica (Italia), y se almacenó durante 30 minutos en estufa a 30±1 °C. Con el fin de observar la pureza bacteriana, se realizó una observación microscópica del cultivo mediante preparado en fresco y tinción de Gram, en Microscopio Óptico Leica DME (Estados Unidos).

Posteriormente se hicieron las diluciones decimales correspondientes y se sembraron en agar GY suplementado con sales (2% glucosa, 0,75% de extracto de levadura, 0,1% MgSO₄·7H₂O, 0,1% (NH₄)₂HPO₄, 1,5% agar). La siembra se hizo por el método de vertido en placa, por duplicado, 1 mL de la dilución en cajas Petri con 20 mL de agar. Se incubaron a 30±1 °C por 7 días. Finalizado el período de incubación se procedió al recuento de BAA, expresando los resultados en UFC/mL. El recuento de BAA se realizó antes y después de la congelación y luego del proceso de deshidratación, a los tiempos 0, 60 y 180 días.

El porcentaje de BAA viables de cada ensayo, fue calculada mediante la expresión:

$$N_i/N_o * 100$$

Donde:

N_f es el logaritmo del número de UFC/mL después del proceso de congelación y liofilización y posterior reconstitución a tiempo 0, 60 y 180 días y para las dos condiciones de almacenamiento.

N_0 es el logaritmo del número de UFC/mL antes del proceso de congelación y liofilización.

6.2.5 MÉTODO DE CONGELACIÓN

Las células bacterianas fueron re-suspendidas en 3,0 mL de las diferentes disoluciones crioprotectoras (glicerol y manitol), y se homogeneizaron completamente. Se colocaron 200 μ L de la suspensión bacteriana en viales y se congelaron durante 4 horas a -110 °C. Posteriormente se almacenaron a -20 °C.

6.2.5.1 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Las bacterias congeladas fueron almacenadas a -20 °C. Los recuentos de viabilidad fueron realizados por duplicado al tiempo 0, 60 y 180 días.

6.2.5.2 CONTROL DE VIABILIDAD

Las BAA congeladas fueron descongeladas a 30 ± 1 °C durante 30 minutos y homogeneizadas en agitador Velp Scientifica (Italia). Seguidamente, se hicieron las diluciones decimales correspondientes y se realizó siembra en agar GY suplementado con sales (2% glucosa, 0,75% de extracto de levadura, 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% $(NH_4)_2HPO_4$, 1,5% agar). La siembra se hizo por el método de vertido en placa, por duplicado, 1 mL de la dilución en cajas Petri con 20 mL de agar. Se incubaron a 30 ± 1 °C por 7 días. Finalizado el período de incubación se realizó el recuento de BAA, el resultado se expresó en UFC/mL. El

recuento de BAA se realizó antes y después de la congelación a los tiempos 0, 60 y 180 días.

El porcentaje de BAA viables de cada ensayo fue calculada mediante la expresión:

$$N_f/N_o*100$$

Donde:

N_f es el logaritmo del número de UFC/mL después del proceso de congelación a tiempo 0, 60 y 180 días

N_o es el logaritmo del número de UFC/mL antes de la congelación.

6.2.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO POST TRATAMIENTO

Transcurrido el tiempo de estudio (180 días) para los tratamientos de conservación de BAA (liofilización y congelación), las mismas fueron sometidas a pruebas de acetificación de mostos alcohólicos para verificar si pierden o no su capacidad de acidificar dichos mostos.

Las bacterias liofilizadas fueron re-hidratadas con 200 μ L de agua de peptona bufferada al 0,5% (Britania), se mezcló vigorosamente con agitador y se almacenó durante 30 minutos en estufa a 30 \pm 1 °C. Seguidamente, se transfirieron los 200 μ L a 5 mL de caldo GY y se incubó durante 48 horas a 30 \pm 1 °C. Posteriormente, los 5 mL de cultivo fueron inoculados en caldo RAE (2% glucosa, 0,8% extracto de levadura, 0,5 % peptona) con 0,5% p/v de AA y 4% v/v de E. Se incubaron a 30 \pm 1 °C en agitador orbital JP SELECTA modelo Rotabit, (España) a 200 rpm, durante 72 horas. El proceso metabólico se siguió midiendo la acidez y la densidad óptica ($DO_{\lambda=540}$), al tiempo 0 y cada 24 horas.

Las bacterias congeladas se descongelaron a 30 \pm 1 °C durante 30 minutos, se homogeneizó y se almacenó durante 30 minutos a 30 \pm 1 °C.

Seguidamente, se sembraron (200 µL) en 5 mL de caldo GY (1% de glucosa, 1% extracto de levadura) y se incubaron en estufa durante 48 horas a 30±1 °C. Posteriormente, los 5 mL de cultivo de BAA fueron inoculadas en caldo RAE (2% glucosa, 0,8% extracto de levadura, 0,5% peptona) con 0,5%p/v de AA y 4% v/v de E. Se incubaron a 30±1 °C en agitador orbital JP SELECTA modelo Rotabit, (España) a 200 rpm, durante 72 horas. El metabolismo de BAA se siguió midiendo la acidez y densidad óptica (DO) al tiempo 0 y cada 24 horas.

6.2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS

6.2.7.1 ACIDEZ FIJA por titulación potenciométrica (AOAC 15TH 942.15 B, 1990), expresando el resultado como g/L de AA.

6.2.7.2 DENSIDAD ÓPTICA (DO): la evolución de la biomasa fue testada por turbidimetría, utilizando la densidad óptica ($DO_{\lambda=540}$), en espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1603 (Japón).

6.2.8 VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN

Para evaluar la velocidad de acetificación se tomaron los resultados de acidez titulable, medidos cada 24 horas, y expresados como g/L de AA. Para el cálculo se usó la fórmula:

$$(VA) = (C_{Af} - C_{Ai}) / (t_f - t_i)$$

donde C_{Ai} y C_{Af} son las concentraciones de AA (g AA/L) inicial y final para los tiempos t_i y t_f , respectivamente (Nieto 1991; Tesfaye et al. 2000).

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de liofilización de las BAA se realizó con cultivos que se encontraban al inicio de la fase estacionaria, de acuerdo a las recomendaciones de algunos autores (Hasegawa 1996; Morgan et al. 2006) y con los lioprotectores manitol al 20% p/v y leche descremada a 10% p/v, que se agregaron para evitar daños durante la deshidratación, como también para mantener la viabilidad y estabilidad de las células durante el almacenamiento (Figura 6.3). Ambos se eligieron teniendo en cuenta investigaciones previas, el manitol al 20% fue utilizado por Ndoye et al. (2007) para liofilizar BAA termoresistentes aisladas de productos de Subsaharan (África), demostrando al evaluar la eficiencia de este crioprotector que las BAA liofilizadas presentan una buena viabilidad y estabilidad para ser usadas en nuevos procesos de acetificación. El manitol al 20% también fue aplicado para liofilizar la especie *A. senegalensis* (Shafiei et al. 2013). En cuanto a la leche descremada en polvo, diversos trabajos reportan su uso como lioprotector; algunos autores la calificaron como el mejor protector (Tsvetkov y Brankova 1983; Reddy et al. 2009), otros la utilizaron para liofilizar bacterias del ácido láctico (Carvalho et al. 2004; Ziadi et al. 2005; Zhao y Zhang 2005; De Giulio et al. 2005; Santivarangkna et al. 2008; Selwal et al. 2011). Burguet-lago et al. (2012) comprobaron su efecto protector sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, ya que los cultivos liofilizados presentaron recuentos por encima de 10^6 UFC/mL durante los 5 años que evaluaron la supervivencia de las distintas bacterias (2012). La leche descremada en polvo ha sido utilizada en concentraciones de 1-10% y en algunos casos mezclada con otras sustancias protectoras (Hubálek 2003).

Si bien existen trabajos donde se evalúa la efectividad del manitol como lioprotector de BAA, no se han encontrado estudios en los que utilicen leche descremada en polvo para liofilizar las mismas, por lo tanto, esta investigación puede dar lugar a nuevos aportes al conocimiento de las BAA.



Figura 6.3 Cultivos de BAA liofilizados en ampollas de vidrio

Las observaciones microscópicas (preparado en fresco y tinción de Gram) pre y post tratamientos permitieron verificar la pureza de los cultivos, es decir la ausencia de microorganismos contaminantes. La homogeneidad y tipicidad de las colonias obtenidas en los ensayos de recuento en placa, también confirmaron la pureza de los cultivos liofilizados y congelados.

6.3.1 EFECTO DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS

Las Tablas 6.1 y 6.2 muestran el número total de BAA viables en cada etapa del proceso de liofilización: antes y después de congelar, después de la deshidratación (Tiempo 0) y una vez transcurridos 60 y 180 días de almacenamiento a 5 °C y a temperatura ambiente, respectivamente. La óptima concentración celular recomendada para la liofilización, está asociada al lioprotector utilizado, pero en general, los recuentos 1.0×10^8 células/mL son apropiados para mantener la viabilidad después del proceso de liofilización (Morgan et al. 2006), Gherna (2013) sugiere recuentos entre 1.0×10^7 y 1.0×10^{10} células/mL para obtener resultados óptimos en el proceso. Los recuentos iniciales de los aislados estudiados, oscilaron entre 2.0×10^8 y 1.5×10^9 UFC/mL, valores levemente inferiores a los reportados en trabajos sobre liofilización de

levaduras (Abadias et al. 2001) y similares a los informados para liofilización de bacterias del ácido láctico (Zamora Rodríguez 2005) y a los recomendados (Gherna, 2013).

Tabla 6.1 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de liofilización de BAA y almacenamiento a 5 °C.

Aislado	Lioprotector	R antes C	R después C	R después L	R 60 días	R 180 días
C1	Manitol 20%	5,35E+08	4,50E+08	4,20E+08	9,15E+07	2,31E+07
	Leche descremada 10%	3,40E+08	3,25E+08	3,30E+08	7,00E+07	2,33E+07
C4	Manitol 20%	1,75E+08	9,50E+07	4,00E+06	2,50E+06	5,20E+05
	Leche descremada 10%	7,25E+08	5,50E+08	4,60E+07	5,00E+06	3,74E+06
C5	Manitol 20%	7,60E+08	2,60E+08	7,75E+07	2,85E+07	4,22E+06
	Leche descremada 10%	5,25E+08	9,50E+07	9,50E+07	2,30E+07	6,50E+06
C6	Manitol 20%	8,70E+08	8,35E+08	2,17E+08	9,95E+07	3,25E+05
	Leche descremada 10%	6,90E+08	5,60E+08	3,35E+08	7,25E+07	2,75E+07
C9	Manitol 20%	5,90E+08	5,75E+08	4,00E+08	3,00E+07	7,00E+06
	Leche descremada 10%	7,50E+08	7,35E+08	5,50E+08	7,43E+07	1,28E+07
A210	Manitol 20%	1,45E+09	1,10E+09	1,62E+08	9,00E+07	1,49E+07
	Leche descremada 10%	5,80E+08	5,25E+08	1,89E+08	1,20E+07	3,31E+07

R: recuento UFC/mL, C: congelación, L: liofilización

La recuperación de los microorganismos demostró que para las cepas estudiadas, la liofilización fue un buen método de conservación; las sustancias lioprotectoras (leche descremada en polvo y manitol) permitieron lograr una buena apariencia de la pastilla liofilizada y su rehidratación instantánea. La leche desnatada en polvo crea una estructura porosa en el producto liofilizado que hace más fácil la rehidratación; también se cree que las proteínas en la leche proporcionan una capa protectora para las células (Abadias et al. 2001).

En el proceso de liofilización, la muerte celular puede ocurrir durante la congelación, la deshidratación y posteriormente durante el almacenamiento y rehidratación de los cultivos (Santivarangkna et al. 2008), debido principalmente a que la célula está sometida a estrés, por la alta concentración

de solutos, bajas temperaturas, pH extremos, formación de cristales de hielo y pérdida de agua (Zhao y Zhang 2005). Es por esto que, luego del proceso, la viabilidad, la pureza y la estabilidad (propiedades funcionales) deben ser revisados y comparados con los resultados iniciales obtenidos previamente a la conservación y también estos controles se deben realizar durante el almacenamiento de los cultivos (Smith 2013).

Tabla 6.2 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de liofilización de BAA y almacenamiento a temperatura ambiente.

Aislado	Lioprotector	R antes C	R después C	R después L	R 60 días	R 180 días
C1	Manitol 20%	5,35E+08	4,50E+08	4,20E+08	5,90E+07	2,65E+05
	Leche descremada 10%	3,40E+08	3,25E+08	3,30E+08	3,50E+07	1,14E+05
C4	Manitol 20%	1,75E+08	9,50E+07	4,00E+06	4,20E+05	8,80E+03
	Leche descremada 10%	7,25E+08	5,50E+08	4,60E+07	6,70E+05	4,35E+03
C5	Manitol 20%	7,60E+08	2,60E+08	7,75E+07	2,65E+06	4,22E+06
	Leche descremada 10%	5,25E+08	9,50E+07	9,50E+07	3,75E+06	6,50E+05
C6	Manitol 20%	8,70E+08	8,35E+08	2,17E+08	3,15E+05	4,00E+04
	Leche descremada 10%	6,90E+08	5,60E+08	3,35E+08	1,90E+06	5,45E+04
C9	Manitol 20%	5,90E+08	5,75E+08	4,00E+08	7,80E+06	7,85E+04
	Leche descremada 10%	7,50E+08	7,35E+08	5,50E+08	5,25E+06	7,50E+04
A210	Manitol 20%	1,45E+09	1,10E+09	1,62E+08	2,38E+06	1,48E+05
	Leche descremada 10%	5,80E+08	5,25E+08	1,89E+08	5,25E+06	1,12E+05

R: recuento UFC/mL, C: congelación, L: liofilización

Como se observa en las Tablas 6.1 y 6.2, prácticamente no hubo diferencias en los recuento antes y después de la congelación con los dos lioprotectores utilizados, sólo los aislados C4 y C5 presentaron una pequeña disminución en dicho recuento, por lo que se puede inferir que en esta etapa no hubo muerte celular. Para visualizar mejor este comportamiento se representó la viabilidad (%) en cada una de las etapas (Figuras 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7). En estas gráficas se puede observar una viabilidad de 99% para todos los aislados,

excepto para el C4 y C5. Resultados similares se obtuvieron en la liofilización de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en presencia de trehalosa como crioprotector, donde la viabilidad alcanzó un 99% (De Giulio et al. 2005).

Luego del proceso de deshidratación, nuevamente, se observa una pequeña disminución en los aislados C4, C5 y A210 independientemente de los lioprotectores utilizados. En esta etapa se alcanzaron valores muy dispares de viabilidad para los distintos aislados entre el 80 y 99% (Figuras 6.4 y 6.5), sin embargo dichos valores se parecen a los hallados por De Giulio et al (2005) al investigar la influencia de distintos lioprotectores (glucosa, trehalosa, maltosa, sacarosa y lactosa) en varias especies de bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). En dicho estudio los porcentajes de viabilidad oscilaron entre 81 y 95%, dependiendo de la especie y el lioprotector empleado (De Giulio et al. 2005).

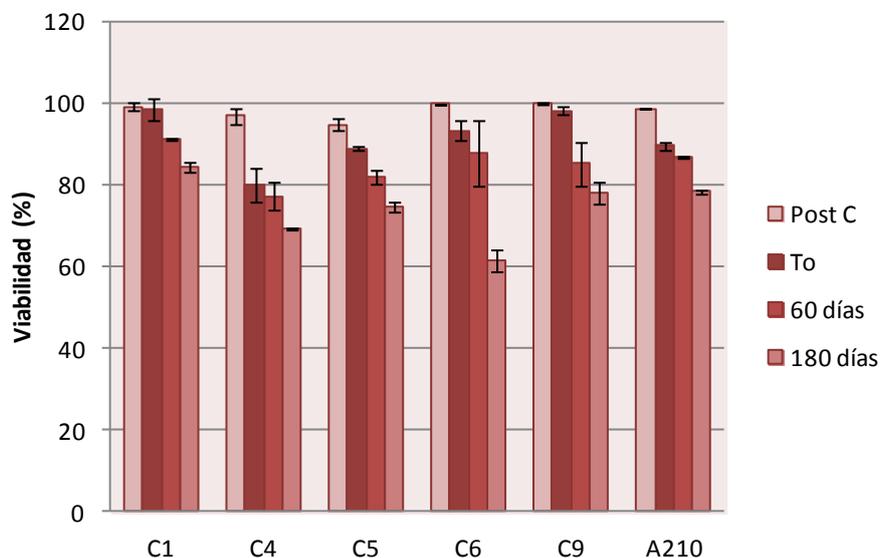


Figura 6.4 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con manitol 20% y conservados a 5 °C. Post C, después de la congelación; To, tiempo cero. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

Se observa que las BAA estudiadas resistieron los procesos de congelación y de deshidratación con un alto porcentaje de supervivientes. Sin embargo, la viabilidad disminuyó a lo largo del tiempo de almacenamiento en las dos condiciones ensayadas (5 °C y temperatura ambiente). Resultados similares fueron encontrados por otros investigadores (De Giulio et al. 2005; Ndoye et al. 2007; De Shafiei et al. 2013).

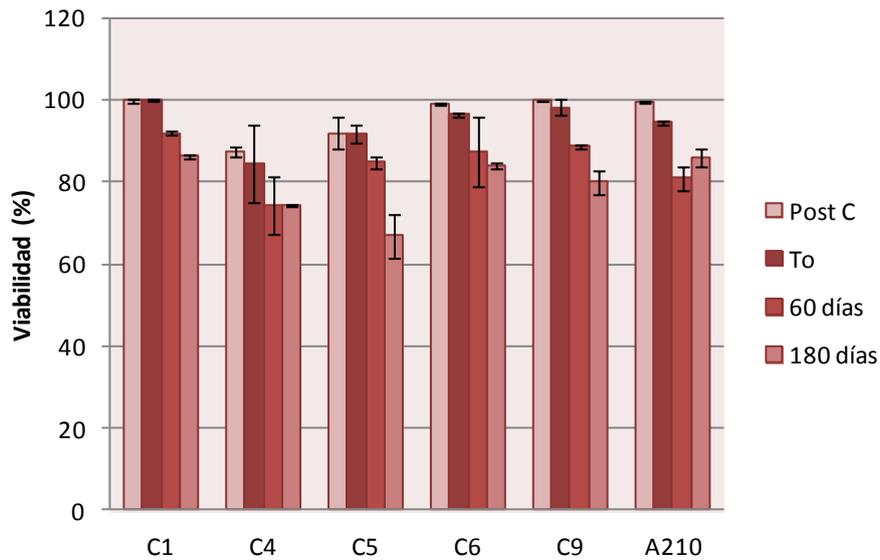


Figura 6.5 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con leche descremada en polvo al 10% y conservados a 5 °C. Post C, después de la congelación; To, tiempo cero. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

Como se observa en las Figuras 6.4 y 6.5, los porcentajes de viabilidad de los distintos aislados disminuyeron utilizando manitol al 20% y leche descremada en polvo al 10%, respectivamente, cuando la temperatura de almacenamiento fue de 5 °C; sobre todo el aislado C6 que presentó el valor más bajo de viabilidad al cabo de los 180 días cuando se usó manitol como crioprotector, alcanzando un 61,5%, y en menor medida en los aislados C4 y C5 que alcanzaron valores de 69 y 75%, respectivamente. Si bien la viabilidad registrada por el aislado C6 fue baja respecto de los otros aislados estudiados,

fue superior en comparación con los valores alcanzados por BAA termoresistentes liofilizadas con 20% de manitol y conservadas a 4 °C durante 6 meses donde sólo llegó a 50±1% (Ndoye et al. 2007). El aislado C1 alcanzó el mayor porcentaje de viabilidad, llegando a 84%. Cuando se utilizó leche descremada en polvo sólo se produjo una reducción del número de bacterias en los aislados C4 y C5, alcanzando valores de viabilidad de 74 y 67% respectivamente, los demás aislados estudiados mostraron recuentos altos que permitieron una viabilidad por encima del 80%, valor superior a los reportados por Ndoye et al. (2007), quienes obtuvieron valores de supervivencia del 50% para BAA después de 6 meses de conservación a 4 °C y en ausencia de oxígeno utilizando manitol al 20% como lioprotector.

Todos los valores de viabilidad obtenidos con leche descremada en polvo al 10% como lioprotector transcurridos los 180 días de almacenamiento a 5 °C, fueron superiores a los conseguidos con manitol al 20% en todos los aislados, excepto en el C5, que con manitol presentó mayor porcentaje de viabilidad que con leche descremada en polvo como lioprotector. Dichos valores, en algunos aislados superan el 80% (C1, C6, C9 y A210), fueron muy superiores a los informados en la liofilización de cultivo de kéfir almacenados a 4 °C durante 180 días, ya que el mismo sólo alcanzó un 62% de viabilidad (Papavasiliou et al. 2008). Los resultados alcanzados son similares a los informados en la liofilización de *Lactobacillus salivarius* con leche descremada en polvo al 20%, donde alcanzaron valores de viabilidad de 85%, pero al cabo de 60 días (Reddy et al. 2009).

Ya ha sido demostrado por otros autores que el uso de sustancias lioprotectoras durante la liofilización y el almacenamiento, permiten mantener la viabilidad de las bacterias en dichos procesos (Ndoye et al. 2007; Reddy et al. 2009; De Giulio et al. 2005; Abadias et al. 2001). El porcentaje de viabilidad de los cultivos liofilizados depende entre otras cosas, del número inicial de células y de la edad de los cultivos (Nakamura 1996; Morgan et al. 2006;), los cultivos muy jóvenes o muy viejos son más susceptibles a tratamientos a bajas

temperaturas que aquellos que se encuentran al final de la fase de crecimiento exponencial o al inicio de la fase estacionaria (Morgan et al. 2006). La presencia de un lioprotector disminuye la a_w , consecuentemente el agua no está disponible para las reacciones de inactivación (Ndoye et al. 2007).

Según la bibliografía consultada hay una mayor tendencia al uso de mezclas de lioprotectores ya que en la mayoría de los casos se obtienen mejores resultados que con las sustancias puras (Abadias et al. 2001; Navarta et al. 2011; Burguet-lago et al. 2012). No obstante, en el presente trabajo se obtuvieron resultados aceptables utilizando un único protector por muestra (manitol o leche descremada en polvo).

6.3.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

En general, las cepas que se almacenaron a temperatura ambiente no controlada (Figuras 6.6 y 6.7) tuvieron una pérdida considerable de la viabilidad en relación con aquellas que se conservaron en refrigeración. Durante el tiempo de almacenamiento de los microorganismos líofilos, la temperatura ambiente ha fluctuado hasta valores de 25 – 30 °C aproximadamente, debido principalmente a que dicho período coincidió con la temporada de verano. Estas temperaturas tan altas durante el almacenamiento podrían provocar una inactivación térmica post-lioofilización, lo que podría ser la causa de la disminución de la viabilidad de las mismas (De Giulio et al. 2005). Pese a todo, estos resultados confirman los resultados de la literatura consultada, ya que son coincidentes con los reportados para otros microorganismos (To y Etzel 1997; Borrego et al. 2001; Ziadi et al. 2005; Ndoye et al. 2007; Shafiei et al. 2013; Gherna 2013).

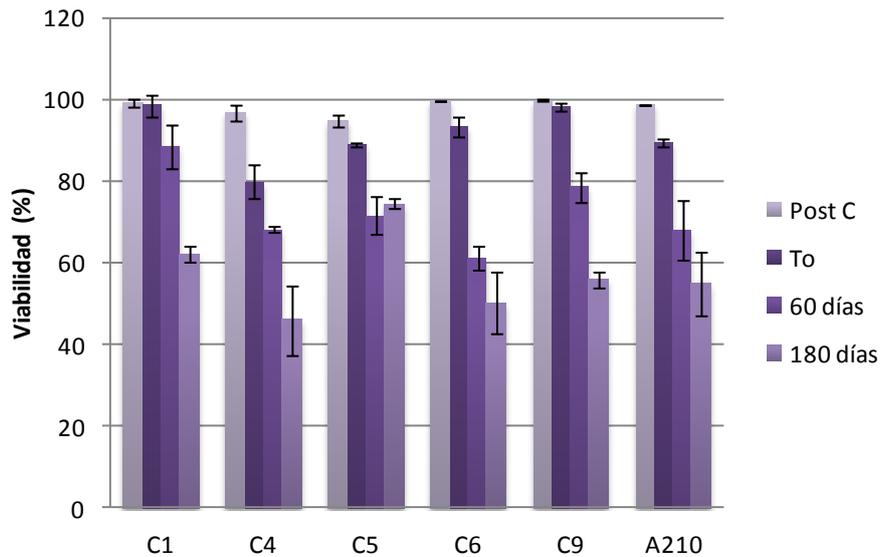


Figura 6.6 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con manitol 20% y conservados a temperatura ambiente. Post C, después de la congelación; To, tiempo cero. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

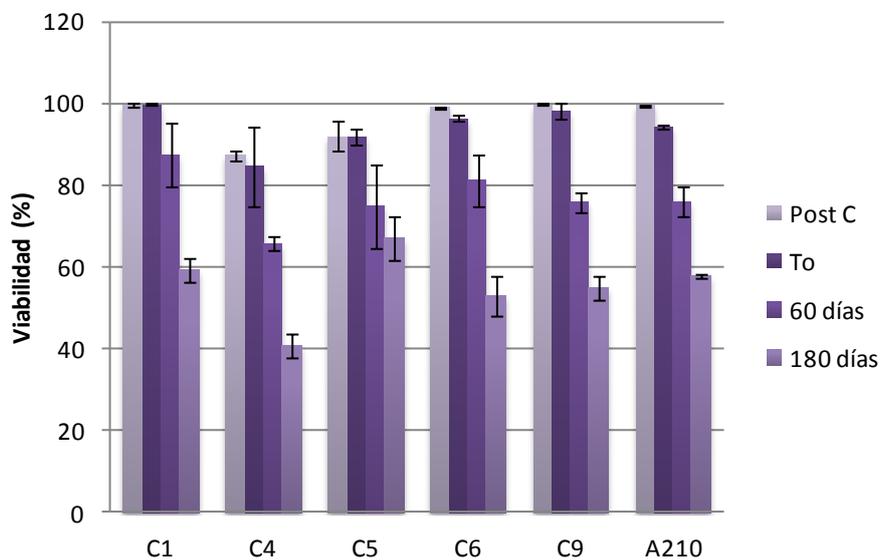


Figura 6.7 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 liofilizados con leche descremada en polvo al 10% y conservados a temperatura ambiente. Post C, después de la congelación; To, tiempo cero. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

La relación entre viabilidad y temperatura de almacenamiento es bien conocida (Ziadi et al. 2005). Desde las primeras investigaciones realizadas en procesos de liofilización se señalaba que las condiciones óptimas para el mantenimiento de las bacterias liofilizadas eran 5 °C y en ausencia de oxígeno (Tsvetkov y Brankova 1983). Publicaciones más recientes afirman que se disminuyen los riesgos de mutaciones si se almacenan en los viales donde se liofilizan, en oscuridad y a 5 °C (Ziadi et al. 2005). Además el mismo autor afirma que a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento, la viabilidad de los cultivos disminuye. Estas afirmaciones también fueron confirmadas en otros estudios; cuando se sometieron BAA liofilizadas con manitol al 20% a distintas temperaturas de conservación (30, 35 y 40 °C) se encontró que a mayor temperatura menor viabilidad, pero que sin embargo la adición de un protector disminuye la inactivación de las células por la temperatura (Ndoye et al. 2007). Además, es interesante destacar que los envases de cultivos lácticos liofilizados de la empresa CHR Hansen, destinados a la producción de productos biotecnológicos derivados de la leche, especifica que se conserven a -18 °C (Hansen 2015).

En los aislados C4 y C6 liofilizados con manitol y glicerol conservados durante 180 días a temperatura ambiente no controlada se observaron valores muy bajos de viabilidad, entre el 40 y el 52% aproximadamente. Mientras que los aislados C1 y C5 presentaron los valores más altos de viabilidad, independientemente del lioprotector utilizado; es decir, que estas cepas tuvieron una mayor resistencia a las condiciones desfavorables, durante el almacenamiento post-liofilización, confirmando el grado de sobrevivientes durante el almacenamiento posterior a la liofilización depende de la especie investigada, tal como lo han indicado algunos autores (Ziadi et al. 2005; Miyamoto-Shinohara et al. 2006).

6.3.3 EFECTO DEL PROCESO DE CONGELACIÓN EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS

El proceso de congelación se realizó con cultivos que se encontraban al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria, siguiendo las recomendaciones de algunos autores (Hasegawa 1996; Sokollek et al. 1998; Morgan et al. 2006). Los recuentos en placa al inicio del proceso de congelación oscilaron entre $8,5 \times 10^7$ y $2,0 \times 10^9$ UFC/mL, valores similares a los indicados por Gherna (Gherna 2013) para la congelación de bacterias, quien propone 10^8 células/mL para lograr óptimos resultados. Se utilizaron dos crioprotectores, glicerol al 20% v/v y manitol al 20% p/v. El uso del glicerol como crioprotector se ha recomendado en concentraciones del 10% v/v (Smith 2013) y 15% v/v (Gherna 2013) para bacterias en general, pero también se ha usado en crioconservación de BAA en otras concentraciones, 25% v/v (Lefebvre et al. 2010) y 35% v/v (Gullo et al. 2012), así como para conservar *Ga. xylinus* (hoy reclasificada como *Ko. xylinus*) en concentraciones de 30% v/v (Wiegand & Klemm 2006). Sin embargo, no se han encontrado estudios acerca del uso del manitol como crioprotector para la conservación de BAA, por lo que los resultados alcanzados en esta Tesis, constituirán un aporte importante al tema.

En la Tabla 6.3 se muestra el número de BAA viables antes de la congelación e inmediatamente después de congelar (Tiempo 0) y luego de transcurridos 60 y 180 días de almacenamiento a -20 °C. La congelación es un proceso físico químico que genera estrés a las células vivas pero que se convierte en una alternativa útil para la conservación de microorganismos bacterianos (Sánchez Leal & Corrales Ramirez 2005). Pese a que no se recomienda la congelación ordinaria a -20 °C para preservar las bacterias debido al daño que provoca a las células (Gherna 2013), los recuentos de BAA no se modificaron considerablemente a lo largo del proceso de congelación y durante el tiempo de almacenamiento, lo que permitió obtener altos valores de viabilidad.

Tabla 6.3 Recuentos de bacterias viables durante el proceso de congelación y almacenamiento de BAA

Aislado	Crioprotector	R antes C	R después C	R 60 días	R 180 días
C1	Manitol 20%	6,30E+08	3,14E+08	2,55E+08	2,80E+08
	Glicerol 20%	8,70E+08	2,38E+08	1,90E+08	1,20E+08
C4	Manitol 20%	8,50E+07	6,15E+07	1,00E+07	6,50E+06
	Glicerol 20%	3,20E+08	2,55E+08	2,85E+07	1,00E+07
C5	Manitol 20%	7,60E+08	5,00E+08	3,60E+08	3,28E+08
	Glicerol 20%	8,15E+08	6,25E+08	1,30E+08	4,40E+07
C6	Manitol 20%	1,65E+08	1,68E+08	6,50E+07	4,60E+07
	Glicerol 20%	4,80E+08	2,12E+08	2,02E+08	1,75E+08
C9	Manitol 20%	2,25E+09	1,40E+09	4,39E+08	3,22E+08
	Glicerol 20%	3,50E+09	2,01E+09	5,85E+08	3,85E+08
A210	Manitol 20%	7,55E+08	3,40E+08	3,05E+08	2,85E+08
	Glicerol 20%	7,95E+08	7,60E+08	5,50E+08	3,81E+08

R: recuento UFC/mL, C: congelación,

La protección de las células bacterianas con un crioprotector es necesaria. El glicerol ha demostrado ser una de las mejores sustancias por cuanto sus características moleculares le permiten simular una vitrificación alrededor de la bacteria (Sánchez Leal & Corrales Ramirez 2005), lo cual impide que la formación de cristales de hielo lesione las membranas citoplasmáticas.

En las Figuras 6.8 y 6.9 se observan los porcentajes de viabilidad de los distintos aislados utilizando manitol al 20% p/v y glicerol al 20% v/v, respectivamente. Cuando se utilizó manitol como crioprotector se obtuvieron valores muy altos de viabilidad, en los aislados C1, C5, C6 y A210, valores cercanos al 100% (96, 96, 95 y 95 % respectivamente). Valores muy similares de viabilidad también se obtuvieron cuando se utilizó glicerol como protector para los aislados C1, C6, C9 y A210 (90, 95, 90 y 97% respectivamente).

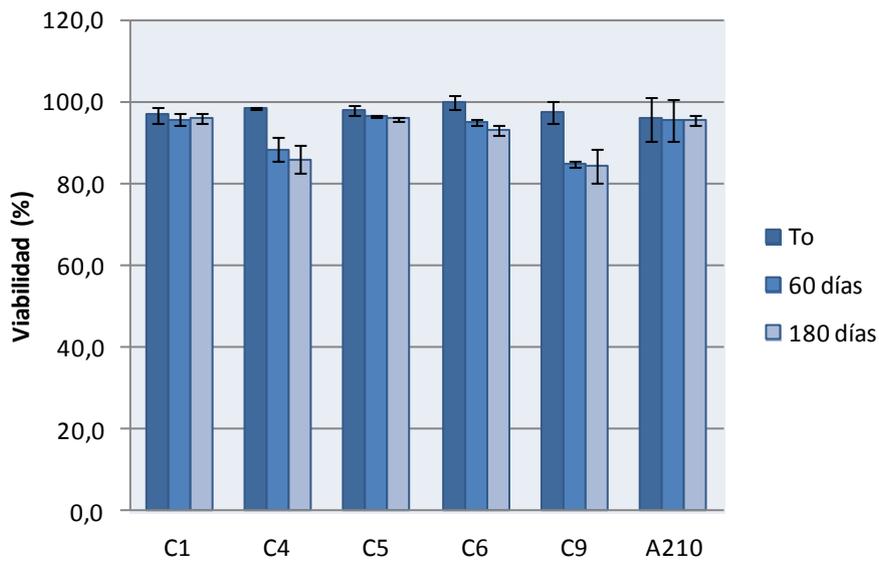


Figura 6.8 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 congelados con manitol 20% y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. To, tiempo cero. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

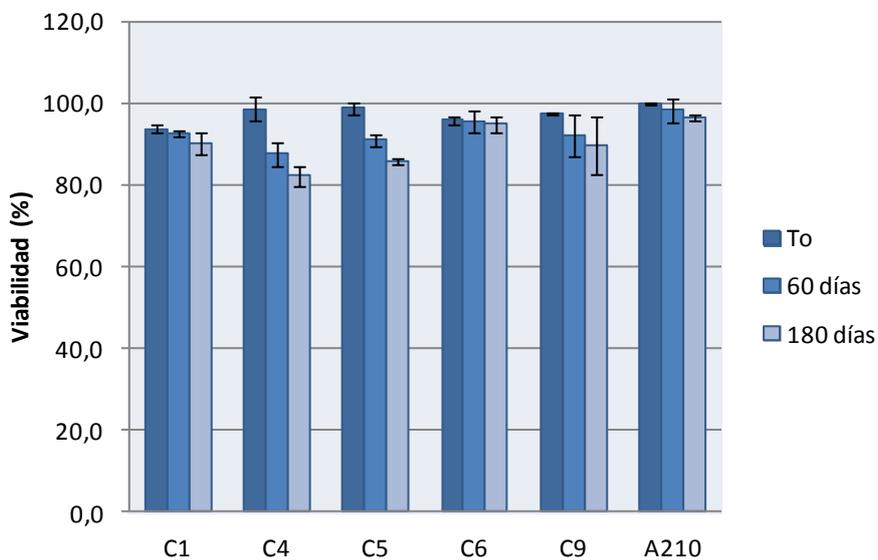


Figura 6.9 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 congelados con glicerol 20% y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

6.3.4 COMPARACIÓN ENTRE LA CONSERVACIÓN DE BAA POR LIOFILIZACIÓN Y POR CONGELACIÓN

En la Figura 6.10 observamos los porcentajes de viabilidad de los aislados estudiados con los distintos tratamientos (liofilización y congelación), al término de los 180 días de almacenamiento en las condiciones detalladas en la metodología. De acuerdo a los resultados hallados, se observa que el procedimiento de congelación permitió para todos los aislados y para los dos crioprotectores utilizados (manitol y glicerol) los más altos valores de viabilidad, correspondientes a recuentos constantes durante el tiempo de proceso, siendo el valor más pequeño 82% para el aislado C4, que en general presentó la menor viabilidad en todos los métodos de conservación ensayados, probablemente debido a que fue el único aislado que presentó un bajo recuento inicial. Con respecto a la liofilización los aislados C1, C9 y A210 alcanzaron valores muy aceptables, superiores al 80%. Del mismo modo, Shafiei et al. (Shafiei et al. 2013) demostraron que el proceso de liofilización, a diferencia de la congelación, influye en la capacidad de multiplicarse, la actividad deshidrogenasa y la integridad de la membrana celular.

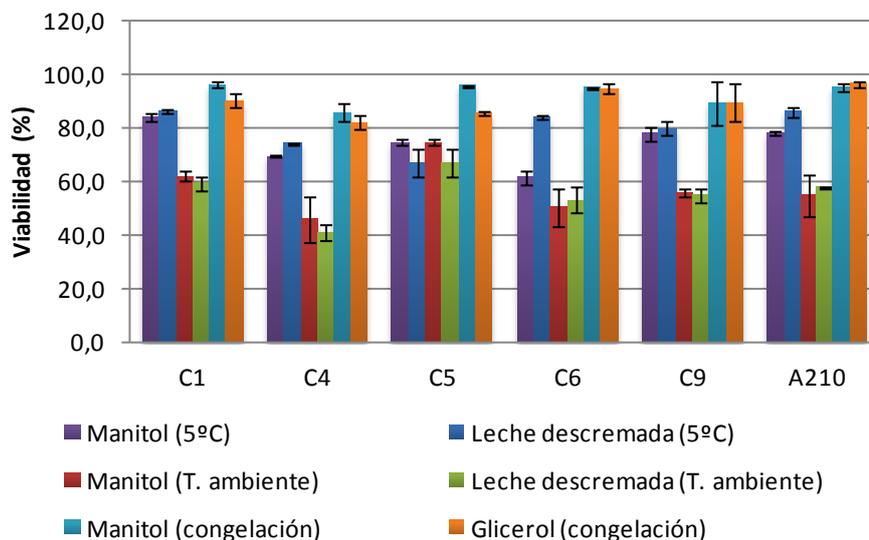


Figura 6.10 Porcentaje de viabilidad de los aislados C1, C4, C5, C6, C9 y A210 con los distintos tratamientos transcurridos los 180 días de almacenamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de dos ensayos.

Está claro que la temperatura de almacenamiento influyó en la viabilidad de las bacterias liofilizadas de acuerdo a los resultados discutidos en la sección 6.3.3, ya que se obtuvieron recuentos más altos en los liófilos almacenados a 5 °C. Y como las condiciones a que fueron sometidas las bacterias para los tratamientos de congelación y liofilización fueron iguales, es decir se partió de un único cultivo y éste se fraccionó para los distintos procesos, se debe descartar la influencia del cultivo, de la centrifugación y de la congelación propiamente dicha (los recuentos pos-congelación, previos a la deshidratación, no se modificaron). Esto induce a pensar, que la deshidratación y posterior almacenamiento (a temperatura ambiente y 5 °C) influyeron en la viabilidad de las bacterias.

6.3.5 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN POST TRATAMIENTO DE LIOFILIZACIÓN Y CONGELACIÓN

Con el fin de evaluar si las BAA en estudio, pierden su capacidad de acetificar un mosto alcohólico después de los tratamientos de conservación, se evaluó la capacidad de los cultivos de biotransformar etanol en ácido acético. Para ello fueron revitalizados para su uso como inóculo, de acuerdo a lo detallado en la metodología. La concentración de AA (0,5% p/v) y E (4,0% p/p) en el medio de cultivo, se eligió teniendo en cuenta los resultados alcanzados en el capítulo 4. Según la bibliografía consultada, hay pocas investigaciones acerca de la influencia de los procesos de conservación (liofilización y congelación) en las propiedades fisiológicas de las BAA, la mayoría de los estudios sólo determinan la viabilidad de las células post tratamiento, como también la integridad de la membrana celular, o bien la influencia del estrés provocado por la desecación en la composición de los ácidos grasos de la membrana celular, y la estabilidad de sus características fenotípicas (Ndoye et al. 2007; Gullo et al. 2012; Shafiei et al. 2013).

La evolución del metabolismo oxidativo fue monitoreado mediante la evaluación de la concentración de AA a lo largo del tiempo ensayado (72 horas), cada 24 horas. Las curvas de crecimiento de las BAA estudiadas están representadas en la Figura 6.11. En las curvas de crecimiento se observa que los aislados C1, C9 y A210 liofilizados y congelados, no presentaron una fase de latencia bien diferenciada; sólo los aislados C1 y A210 liofilizados con manitol tuvieron una fase de latencia de 24 horas. Posteriormente, los aislados alcanzaron su fase de crecimiento exponencial logrando para los cultivos congelados valores de DO similares a los que presentaba el cultivo sin tratamiento. Sin embargo, se observó que la DO de los cultivos liofilizados fue menor respecto del cultivo sin tratamiento y de los cultivos congelados. De acuerdo a los resultados, se podría señalar que la congelación como método de conservación de las BAA, independientemente del crioprotector que se utilice, no afecta a la capacidad de crecimiento de las mismas. Por el contrario, observando las curvas de crecimiento de las bacterias liofilizadas, se podría deducir que la liofilización afectó el crecimiento de las BAA.

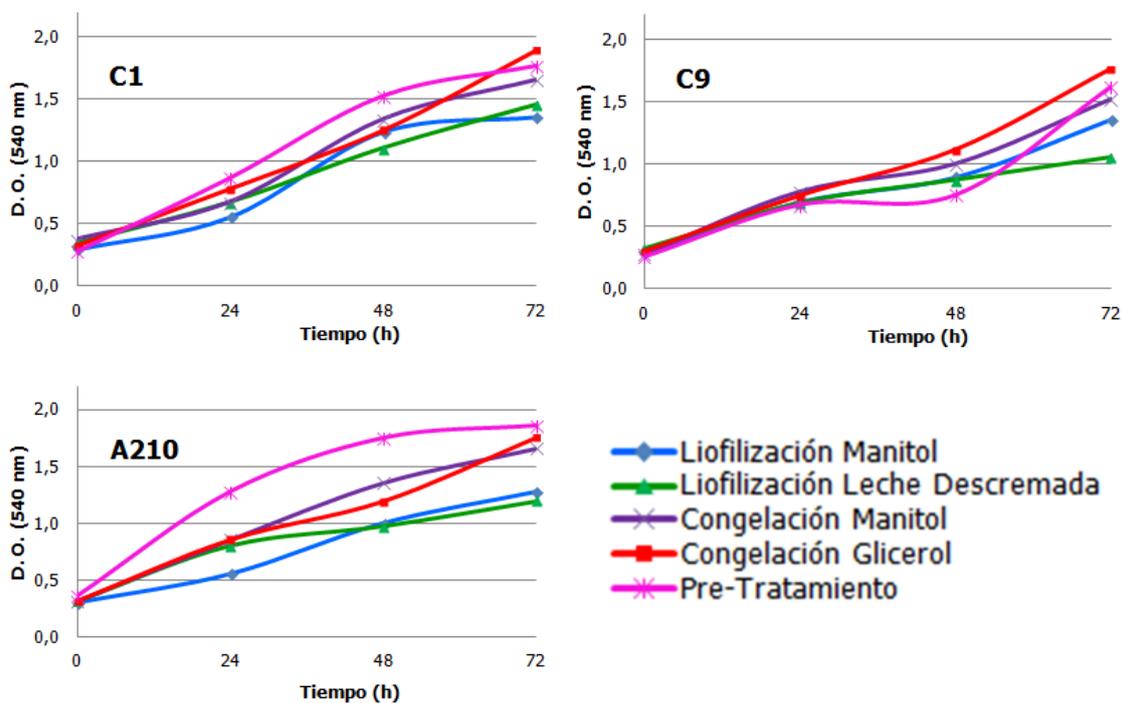


Figura N° 6.11 Curvas de crecimiento de los aislados C1, C9 y A210 en caldo RAE a 30 °C y 4% E - 0,5% AA.

En la Figura 6.12 se observa la velocidad de acetificación de los aislados después de la congelación y liofilización y sin tratamiento alguno. En la misma, se puede ver que la velocidad de acetificación fue más baja en los cultivos liofilizados, ya sea con leche descremada en polvo o con manitol; en cambio, la velocidad de acetificación de los aislados congelados fue más alta, y muy cercana al valor alcanzado cuando el aislado no fue sometido a tratamientos de conservación. Los resultados alcanzados en el proceso de liofilización se oponen a los estudios realizados por Sokollek y Hammes (1997), quienes liofilizaron una cepa aislada de vinagre de vino rojo, posteriormente identificada como *Acetobacter* sp. (Sokollek et al. 1998), utilizando 20% de extracto de malta como lioprotector; ellos evaluaron las propiedades fisiológicas de la misma luego del tratamiento y encontraron que el mismo no afectó la productividad de AA. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los ensayos fueron realizados en diferentes condiciones, distinto lioprotector y distinto caldo utilizado, (medio RAE con 2% de E y 1% AA), lo que pudo influir en los resultados alcanzados.

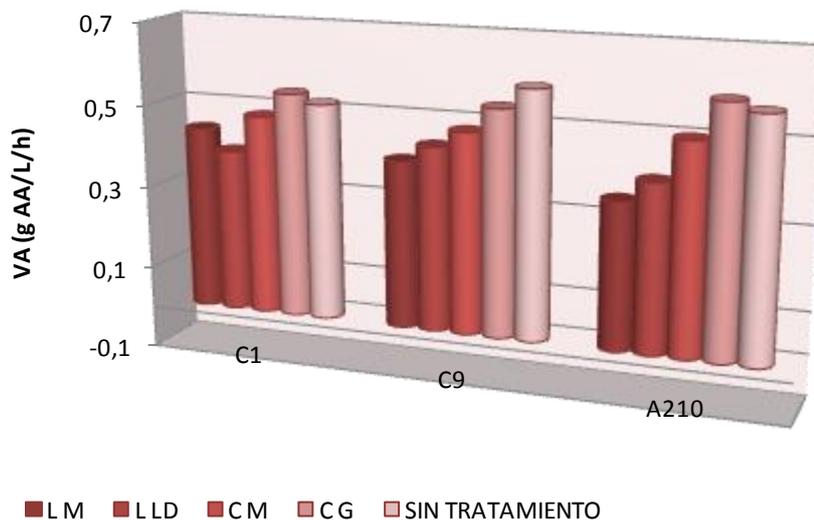


Figura 6.12 Velocidades de acetificación para los aislados C1, C9 y A210 en caldo RAE a 30 °C y 4% E - 0,5% A luego de 72 horas; antes de someterlos a los diferentes tratamientos y luego de los mismos, transcurrido los 180 días de almacenamiento. LM, liofilización con manitol; LLD, liofilización con leche descremada; CM, congelación con manitol; CG, congelación con glicerol.

Como se observa en la Figura 6.12, la velocidad de acetificación de los aislados congelados se mantiene respecto de los aislados que no fueron sometidos a tratamiento alguno. Resultados similares fueron informados para la especie *A. pasteurianus* congelada durante 9 años con 35% de glicerol a -80 °C, que mantiene la capacidad de transformar el E en AA y las propiedades fenotípicas, luego de transcurrido el tiempo de almacenamiento (Gullo et al. 2012).

Otros autores liofilizaron *A. senegalensis* con el mismo lioprotector utilizado en este estudio (manitol al 20%), sin embargo sólo evaluaron la influencia del proceso y las condiciones de almacenamiento en la capacidad de multiplicación, la respiración y la integridad de la membrana celular, no así la estabilidad de las propiedades fisiológicas (Shafiei et al. 2013).

La comparación de estos resultados con los datos derivados de las investigaciones del capítulo 4 revela que para el tratamiento de conservación de las BAA mediante congelación utilizando manitol al 20% p/v o glicerol al 20% v/v, las propiedades fisiológicas se mantuvieron constantes y, por lo tanto, las BAA podrían ser preservadas por este método sin cambios de las propiedades esenciales. En cambio, la liofilización utilizando manitol 20% p/v y leche descremada al 10% p/v como crioprotector ha modificado levemente la capacidad de acetificar un mosto alcohólico. Se debería probar con otros crioprotectores que permitan mantener las propiedades fisiológicas durante el tiempo de almacenamiento.

6.4 CONCLUSIONES

Un proceso de acetificación requiere alta producción de biomasa (BAA). Estas podrían ser liofilizadas o congeladas manteniendo una buena viabilidad y podrían ser utilizadas como starters para nuevos procesos de acetificación.

Los protectores ensayados en este estudio podrían ser utilizados para conservar las bacterias mediante liofilización y congelación, ya que los mismos demostraron ser efectivos para mantener la viabilidad de las células.

Al emplear la liofilización como método de conservación se comprobó que la misma podría utilizarse como método de preservación de BAA, ya que se demostró que puede ser efectiva para mantener la viabilidad de las BAA. Sin embargo, los lioprotectores utilizados en este estudio (manitol y leche descremada en polvo) no permitieron mantener una de las propiedades funcionales de las BAA, como es la producción de ácido acético a partir de E. Los resultados confirman que se produce ácido acético, pero con menor velocidad respecto a las bacterias que no han sido sometidas a procesos de liofilización.

El presente estudio demuestra que el glicerol y el manitol pueden ser utilizados como crioprotectores en el proceso de congelación, ya que no sólo protegen a las BAA, manteniendo su viabilidad, sino que también ayudan a conservar las propiedades funcionales de las mismas, tales como su capacidad de crecer y producir ácido acético en mostos alcohólicos.

6.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J. y Vias, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 173–182.

Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsuhita, K., Fujita, N. y Shirai, M. (2009). Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 37(17), 5768–5783.

- Borrego, S., Espinosa, M. E., Carballo, M. E., Moreira, T., Martí, E. y Ramírez, A. (2001). Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Bioteología Aplicada*, 18, 85–87.
- Burguet-Lago, N., Sierra-prado, N. y Brito-godoy, L. C. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 3–6.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. y Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835–847.
- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. y Nazzaro, F. (2005). Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 739–746.
- De Vero, L. y Giudici, P. (2013). Significance and management of acetic acid bacteria culture collections. *Acetic Acid Bacteria*, 2(s1):e9, 54-61.
- De Vuyst, L. (2000). Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2), 105–112.
- Fonseca, F., Béal, C. y Corrieu, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 43(3), 189–198.
- Gherna, R. L. (2013). Culture Preservation. In M. C. Flickinger (Ed.), *Upstream Industrial Biotechnology*. John Wiley y Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gullo, M., Mamlouk, D., De Vero, L. y Giudici, P. (2012). *Acetobacter pasteurianus* strain AB0220: cultivability and phenotypic stability over 9 years of preservation. *Current Microbiology*, 64(6), 576–80.

- Hansen, C. (2015). Chr Hansen. Improving food y health. Disponible en: <http://www.chr-hansen.com/>
- Hasegawa, T. (1996). History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques. In J. C. Hunter-Cevera y A. Belt (Eds.), *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press. San Diego, California.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205–229.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N. y De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716.
- Miliwebsky, E. y Rivas, M. (2011). Principios y aplicaciones de la PCR-RFLP. In L. Merino y G. Giusiano (Eds.), *Manual de Métodos Moleculares para estudios Microbiológicos* (1º Edición). Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T. y Nakahara, T. (2006). Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, 52(1), 27–32.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A. y Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183–193.
- Nakamura, L. K. (1996). Preservation and Maintenance of Eubacteria. In J. C. Hunter-Cevera y A. Belt (Eds.), *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press. San Diego, California:
- Navarta, L. G., Calvo, J., Calvente, V., Benuzzi, D. y Sanz, M. I. (2011). Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: Study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures. *Letters in Applied Microbiology*, 53(5), 565–571.

- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Destain, J., Guiro, A. y Thonart, P. (2009). Preservation of vinegar acetic acid bacteria. In L. Solieri y P. Giudicci (Eds.), *Vinegars of the World* (pp. 61–71). Springer- Verlag Italia. Milán, Italia.
- Ndoye, B., Weekers, F., Diawara, B., Guiro, A. T. y Thonart, P. (2007). Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1374–1382.
- Nieto, F. J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. In C. Llaguno Marchena y M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 69–103). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Nomura, Y., Yamamoto, M., Matsushita, K. y Kumagai, H. (1998). Preparation and preservation of freeze-dried cells of acetic acid bacteria with aldehyde oxidase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(6), 1134–1137.
- Ohmori, S., Uozumi, T. y Beppu, T. (1982). Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(2), 381–389.
- Papavasiliou, G., Kourkoutas, Y., Rapti, a., Sipsas, V., Soupioni, M. y Koutinas, A. A. (2008). Production of freeze-dried kefir culture using whey. *International Dairy Journal*, 18(3), 247–254.
- Reddy, K. B. P. K., Awasthi, S. P., Madhu, A. N. y Prapulla, S. G. (2009). Role of Cryoprotectants on the Viability and Functional Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying. *Food Biotechnology*, 23(3), 243–265.
- Sánchez Leal, L. C. y Corrales Ramirez, L. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA-Publicación Científica*, 3(3), 109-113.

- Santivarangkna, C., Kulozik, U. y Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 1–13.
- Schuller, G., Hertel, C. y Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2013–2020.
- Selwal, K. K., Selwal, M. K. y Gandhi, D. N. (2011). Effect of freeze drying process on some properties of *Streptococcus thermophilus* isolated from dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1500–1505.
- Shafiei, R., Delvigne, F. y Thonart, P. (2013). Flow-cytometric assessment of damages to *Acetobacter senegalensis* during freeze-drying process and storage. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s):e10, 62-70.
- Sievers, M. y Swings, J. (2005). Family *Acetobacteraceae*. In G. M. Garrity (Ed.), *Bergey's Manual of Bacteriology*. Springer-Verlag. New York.
- Smith, D. (2003). Culture collections over the world. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 6(2), 95–100.
- Smith, D. (2013). Culture Collections and Biological Resource Centers (BRCs). In M. C. Flickinger (Ed.), *Upstream Industrial Biotechnology*. John Wiley y Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 3195–206.
- Sokollek, S. J. y Hammes, W. P. (1997). Description of a Starter Culture Preparation for Vinegar Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 481–491.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C. y Troncoso, A. M. (2000). Set up and optimization of a laboratory scale fermentor for the production of wine vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.

- To, B. C. S., y Etzel, M. R. (1997). Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after spray dryin, freeze drying, or freezing cell cultivation. *Processing*, 62(1), 167–171.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9º Edición). Editorial Médica Panamericana S.A.C.F. Buenos Aires.
- Tsvetkov, T. y Brankova, R. (1983). Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, 20(3), 318–323.
- Wiegand, C. y Klemm, D. (2006). Influence of protective agents for preservation of *Gluconacetobacter xylinus* on its cellulose production. *Cellulose*, 13(4), 485–492.
- Zamora Rodríguez, L. M. (2005). *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas*. Tesis Doctoral. Univeritat de Girona.
- Zhao, G. y Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333–338.
- Ziadi, M., Touhami, Y., Achour, M., Thonart, P. y Hamdi, M. (2005). The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochemical Engineering Journal*, 24(2), 141–145.

CAPÍTULO N° 7
DISCUSIÓN GENERAL

7.1 DISCUSIÓN GENERAL

La actividad de las bacterias acéticas se conoce desde hace siglos por la producción de vinagre, la acetificación de bebidas alcohólicas y el deterioro de los frutos. Estas bacterias han sido estudiadas desde la época de Pasteur, sin embargo en estos últimos años, la diversidad de BAA ha sido objeto de un mayor interés por parte de los microbiólogos y se han realizado estudios ecológicos de las mismas en distintas regiones del mundo, principalmente en regiones tropicales (Tailandia, Indonesia, Filipinas, Japón). Esto se debe al avance de las modernas técnicas moleculares, particularmente la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S (Komagata et al. 2014), mediante las cuales se han realizado numerosos estudios taxonómicos que permitieron revisar la nomenclatura y clasificación de las mismas. Además, debido a que la presencia de estas bacterias, tanto en la materia prima como en cada una de las etapas de producción, puede alterar la calidad del vino, hay un mayor interés en controlar el proceso productivo durante la transformación del mosto de uva en vino, por lo que se han realizado numerosos estudios para evaluar la presencia de BAA en las distintas etapas de elaboración de los vinos. Asimismo, el estudio de BAA en la producción de vinagre permite llevar a cabo procesos controlados, lo que redundará positivamente en el rendimiento de producto.

Recientemente, se han realizado estudios que demostraron la patogenicidad de algunas especies de BAA para los seres humanos, entre ellas *Granulibacter bethesdensis*, *Asaia bogorensis* y *Asaia lannensis* (Komagata et al. 2014). Las fuentes y vías de infección son aún desconocidas, pero se sospecha que es a través de las sondas vesicales (Alauzet et al. 2010). Además, como son resistentes a la mayoría de los antibióticos, éstas especies son llamadas por los médicos y microbiólogos patógenos oportunistas emergentes (Komagata et al. 2014). Por otro lado, otras investigaciones señalan que las BAA pueden ser utilizadas como probióticos y podrían tener efecto sobre células cancerosas (Haghshenas et al. 2015a; Haghshenas et al. 2015b). Particularmente *A. indonesiensis* aislada de yogur y *A. syzygii* aislada de cuajada, exhiben propiedades típicas probióticas, como la tolerancia deseable a pH bajo y alta

concentración de sales biliares, funciones inhibitoras contra patógenos y una aceptable susceptibilidad a los antibióticos (Haghshenas et al. 2015a).

Desde la descripción del género *Acetobacter* en 1898, y del género *Gluconobacter* casi 40 años más tarde, en 1935, la taxonomía de las bacterias del ácido acético se ha actualizado varias veces (Yamada y Yukphan, 2008; Ilse Cleenwerck y De Vos, 2008; Trček y Barja, 2015). En los últimos 20 años han sido descritas más de 70 nuevas especies, de las cuales más de 20 pertenecen al género *Gluconacetobacter* (Trček y Barja, 2015). En el sitio <http://www.bacterio.net>, fundado por Jean P. Euzéby (1987), se puede seguir la actualización taxonómica de las células procariotas, entre ellas las bacterias del ácido acético.

Las BAA son un ejemplo típico de organismos con capacidad de adaptarse rápidamente a los diferentes hábitats y también para competir con éxito con otros microorganismos. La literatura describe muchas de sus características extraordinarias que podrían explicar su alta competitividad: la producción eficiente de ácidos a partir de azúcares, la resistencia a valores de pH bajos, la producción de polisacáridos extracelulares y el estado de viables, pero no cultivables (Trček y Barja 2015). Debido a su capacidad de desarrollarse a pH bajos, es factible encontrarlas en alimentos ácidos, tales como zumos de frutas. Se han encontrado BAA en frutas tales como: mango, banana, manzana, pera, frutilla, ananá, coco, uva, tomate, naranja, lima, sandía, papaya, etc. (Komagata et al. 2014). Se reportan muy pocas investigaciones sobre el aislamiento de BAA en naranjas y se podría decir que ninguna en arándanos. Por ello y atendiendo al hecho de que la región de Salto Grande (provincia de Entre Ríos, Argentina) se destaca por la producción de frutas cítricas y arándanos, uno de los objetivos del presente trabajo fue aislar, caracterizar e identificar estas bacterias a partir de dichas frutas, con el fin de utilizarlas en la producción de vinagres típicos de la zona.

Para la recuperación de las células bacterianas se utilizaron caldos de enriquecimiento de diferente composición química. Así, en el medio

denominado **I**, que contiene glucosa, extracto de levadura y etanol, se recuperó el mayor número de microorganismos (18 BAA), probablemente favorecidos por el contenido en etanol, ya que es bien sabido que las BAA se adaptan perfectamente a este tipo de medio; de hecho, uno de sus principales hábitats son las bebidas alcohólicas. No es casual entonces que este caldo sea el recomendado por muchos autores para aislar la mayoría de los géneros de BAA (Kerstens et al. 2006; Lisdiyanti et al. 2003). Los aislados correspondieron mayoritariamente al género *Acetobacter* y en menor proporción a *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Asaia* y *Saccharibacter*. Los medios de enriquecimiento **II** y **III** permitieron el aislamiento de BAA, pero en menor medida. El caldo denominado **II** contiene ácido acético, el cual podría actuar como inhibidor del crecimiento bacteriano, y el medio denominado **III** es un caldo de enriquecimiento más adecuado para el aislamiento de bacterias a partir de alimentos fermentados y no de fruta fresca (Moonmangmee et al. 2003).

Además de la recuperación de bacterias a partir de fruta fresca se hizo lo propio partiendo de jugo fermentado de naranja utilizando los mismos caldos de enriquecimiento; obteniéndose un mayor número de BAA respecto del jugo fresco o la cáscara, debido al efecto selectivo del etanol.

Tradicionalmente, las especies bacterianas se identificaban de acuerdo a criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (González et al. 2005). Sin embargo, con el desarrollo de las técnicas de Biología Molecular, estas pruebas sólo son utilizadas como complementarias a la hora de caracterizar a los microorganismos y los criterios utilizados actualmente para la clasificación e identificación bacteriana son genotípicos o moleculares. Una vez aisladas las BAA, se realizó una primera identificación a nivel de género mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas, ya que hay ciertas características fenotípicas que pueden contribuir a la diferenciación genérica de la familia *Acetobacteraceae*; así por ejemplo, los géneros *Gluconacetobacter* y *Acetobacter* pueden diferenciarse entre sí porque poseen distintas ubiquinonas Q10 y Q9, y estos se distinguen de *Gluconobacter* porque este último no oxida el lactato y el acetato

a CO₂ y H₂O como si lo hacen los géneros *Gluconacetobacter* y *Acetobacter* (Malimas et al. 2013).

En las 36 BAA aisladas, de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas se pudieron reconocer 6 géneros: 13 aislamientos fueron identificados como *Acetobacter*, 5 *Gluconobacter*, 7 *Asaia*, 5 *Acidomonas*, 1 *Gluconacetobacter* y 5 *Saccharibacter*. Como el objetivo principal del aislamiento de BAA a partir de arándanos y frutas cítricas fue obtener bacterias aptas para desarrollar un cultivo iniciador destinado a un proceso biotecnológico (vinagre de frutas), los estudios posteriores de identificación por métodos moleculares, pruebas de acetificación y de conservación, fueron realizados sólo con los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*, ya que estos son los géneros utilizados en la elaboración de vinagres (Gullo et al. 2006).

En el presente estudio se emplearon dos técnicas moleculares rápidas para identificación de BAA a nivel de género y especie, PCR-RFLP del gen 16S y del espacio intergénico 16S-23S. Estas técnicas han sido utilizadas como método rutinario para identificar BAA aisladas y para caracterizar las cepas de referencia (Poblet et al. 2000; Ruiz et al. 2000; González et al. 2004; Prieto et al. 2007; Barata et al. 2012; Navarro et al. 2013). Las enzimas utilizadas para la generación de los fragmentos de restricción de BAA a partir de los productos de PCR del gen 16S y del espaciador ITS 16S-23S fueron: *Hae*III, *Msp*I, *Cfo*I, *Taq*I, *Alu*I, *Tru*I y *Rsa*I. La identificación se realizó por comparación de los fragmentos formados en las BAA aisladas, con respecto de los fragmentos de especies conocidas y encontrados en la bibliografía consultada.

El estudio de PCR-RFLP del gen 16S permitió identificar las 16 BAA estudiadas. 7 aislados (5 a partir de frutas cítricas y 2 a partir de arándano) fueron identificados como *A. pasteurianus*, 6 (3 de cítricos y 3 de arándanos), como *G. frateurii*, 2 (recuperado de arándanos), como *A. tropicalis* y 1 (recuperado de cítricos), como *A. syzygii*. El análisis de PCR-RFLP del ITS 16S-23S permitió confirmar estos resultados para todos los aislados excepto para

C1. Éste, identificado como *G. frateurii* mediante RFLP del 16S, mostró patrones de restricción iguales a *A. pasteurianus* cuando se utilizó la técnica PCR-RFLP del ITS 16S-23S. Esto confirmó lo afirmado por otros autores respecto del mayor poder discriminatorio de la técnica PCR-RFLP del ITS 16S-23S respecto del 16S ADNr debido a que presenta mayor polimorfismo (González y Mas 2011). Esta discrepancia encontrada en los resultados fue resuelta mediante la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S, ya que se confirmó que el mismo es *A. pasteurianus* con un 98% de identidad, lo que se corresponde con los resultados obtenidos del corte con enzimas de restricción del espacio intergénico 16S-23S.

La secuenciación parcial del gen 16S de los aislados se realizó para corroborar los resultados hallados en el estudio de PCR-RFLP, lo cual se demostró en todos los aislados. Sin embargo, las secuencias obtenidas de los aislados C2 y A140 presentaron muchas bases ambiguas, y consecuentemente, la identificación presentó valores de identidad muy bajos, de 88 y 89% respectivamente, lo que impidió que puedan ser utilizadas para la construcción del árbol filogenético. Sería necesario realizar una nueva secuenciación con un producto de PCR de mejor calidad o utilizar otros cebadores en la secuenciación, para obtener una secuencia que permita identificar los aislados con un mayor porcentaje de identidad.

El árbol filogenético construido con las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de los aislados permitió diferenciar dos grupos, en el grupo I se encuentran los aislados identificados dentro del género *Acetobacter* y se definieron tres subgrupos (*A. pasteurianus*, *A. tropicalis* y *A. syzygii*) y en el grupo II se encuentran los aislados identificados como *G. frateurii*.

Los resultados del aislamiento de BAA demostraron que: 1º) la recuperación de BAA, fue más eficiente en las frutas cítricas.- 2º) la especie predominante fue *Acetobacter pasteurianus*, seguido de *G. frateurii* y *A. tropicalis*.- 3º) a partir de jugo fermentado de naranjas se pudo recuperar la especie *A. syzygii*.

La capacidad de las BAA de producir altas concentraciones de ácido acético a partir de etanol se utiliza en la producción industrial de vinagres (Sengun y Karabiyikli 2011). Se producen vinagres a partir de distintas materias primas: vinos, cervezas, almidones hidrolizados, miel, cereales, frutas, vegetales. Como ejemplos se puede citar el vinagre de arroz, que es consumido mayormente en el este y sureste de Asia, el vinagre de manzana en USA y Canadá, el de uva en España; y un lugar destacado tienen los acetos balsámicos italianos (aceto balsámico tradicional de Módena y de Reggio Emilia) (Solieri y Giudicci 2009).

A pesar de los intentos de estandarizar el proceso de acetificación para la elaboración de vinagres, todavía, no hay disponible en el mercado un cultivo iniciador (starter) de BAA. La falta de arrancadores puede causar varios problemas en la producción de vinagre y, consecuentemente, pérdidas económicas. Contar con un cultivo starter fiable podría acelerar el comienzo de la oxidación, así como también, disminuir los problemas de contaminación y los tiempos de proceso (Ndoye et al. 2009).

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, además de aumentar el conocimiento de las BAA, fue obtener, con las BAA aisladas, un cultivo iniciador caracterizado para elaborar vinagres con frutas de la región (frutas cítricas y arándanos), como alternativas para la industrialización de los excedentes de producción. Con este propósito se estudió la dinámica de crecimiento y la habilidad para producir AA de BAA aisladas de arándanos y frutas cítricas, con el fin de elegir las más aptas para la acetificación de mostos de frutas.

Se realizaron ensayos para evaluar el crecimiento con distintas concentraciones de E y AA teniendo en cuenta que valores altos de los recuentos celulares son considerados esenciales para los inóculos destinados al arranque en la producción de vinagre, a fin de lograr una fase de latencia corta y de esta manera disminuir tiempos de proceso lo que redundaría en bajos costos de producción. Como resultado de este estudio, se pudo comprobar que en

muchos de los aislados se alcanzaron recuentos superiores a 10^9 células/mL, valores más que suficientes para considerarlos entre los cultivos a utilizar para el posterior proceso biotecnológico.

En cuanto a la habilidad para producir AA, se ensayaron tres concentraciones de etanol, 4%, 6% y 8% v/v, evidenciándose que los cultivos, identificados como *A. pasteurianus* (A210 y C1) *A. syzygii* (C9) y *G. frateurii* (A80) podrían ser utilizados como inóculo para la elaboración de vinagres, por poseer una alta capacidad de producción de AA cuando la concentración de E es de 4% y 6% v/v. Valores de E, por encima del 8% v/v no podrían ser utilizados, debido a su efecto inhibitor en el crecimiento y en la producción de AA.

Para conservar correctamente cultivos microbianos destinados a procesos biotecnológicos se deben cumplir los siguientes objetivos: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, que estas células permanezcan genéticamente estables, preservando los niveles de su productividad inicial y por último, que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Como alternativas de conservación de los cultivos de BAA, para ser usadas en la elaboración de vinagres, se evaluaron los procesos de liofilización y congelación.

Para la liofilización se emplearon los lioprotectores manitol al 20% p/v y leche descremada a 10% p/v, los cuales se agregaron para evitar daños durante la deshidratación, como también para mantener la viabilidad y estabilidad de las células durante el almacenamiento, y se ensayaron dos condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente y 5°C). Los aislados C1, C9 y A210 alcanzaron valores de viabilidad aceptable, superiores al 80%. Los porcentajes de viabilidad hallados demostraron que la temperatura de almacenamiento es un parámetro a tener en cuenta, ya que los cultivos

liofilizados y mantenidos a temperatura ambiente presentaron valores más bajos que los mantenidos a temperaturas de 5°C.

Para el proceso de congelación se utilizaron dos crioprotectores, glicerol al 20% v/v y manitol al 20% p/v, encontrándose que este procedimiento permitió para todos los aislados y para los crioprotectores utilizados valores altos de viabilidad, superiores en algunos casos a los obtenidos en el tratamiento de liofilización.

Cuando se evaluó la VA de los aislados en un mosto alcohólico luego de ser sometidos a los procesos de congelación y liofilización, se encontraron diferencias en la VA para los dos tratamientos, ya que los aislados preservados mediante congelación mantuvieron su propiedad de acidificar respecto de los aislados no sometidos a tratamientos; en cambio los conservados por liofilización modificaron levemente dicha capacidad.

Como la liofilización, utilizando manitol o leche descremada como lioprotectores, no permitió mantener una de las propiedades funcionales de las BAA, como es la producción de ácido acético a partir de E, sería necesario realizar nuevas experiencias con otros lioprotectores que permitan mantener la VA de las BAA. En cambio, el glicerol y el manitol podrían ser utilizados como crioprotectores en el proceso de congelación, ya que no sólo protegen a las BAA, manteniendo su viabilidad, sino que también ayudan a conservar las propiedades funcionales de las mismas, tales como su capacidad de crecer y producir ácido acético en mostos alcohólicos.

El aislamiento e identificación de BAA a partir de arándanos y frutas cítricas en la región de Salto Grande permitió encontrar las especies: *A. pasteurianus*, *A. tropicalis*, *A. syzygii* y *G. frateurii*. Es la primera investigación de estas bacterias que se realiza en la región, inclusive en el país (Argentina), o al menos no se han documentado investigaciones de este tipo.

A. pasteurianus es una de las especies más estudiadas, ya que fue una de las primeras conocidas dentro de la familia *Acetobacteriaceae*. Se ha aislado

de numerosas fuentes, principalmente a partir de productos fermentados (vinagre, pickles, kéfir, vinos, cerveza), pero también a partir de flores y frutas (Komagata et al. 2014). Numerosas investigaciones reportan su uso en la obtención de vinagres. Hay trabajos que reportan aislamientos de *A. pasteurianus* en cítricos, particularmente en naranjas provenientes de zonas tropicales (Tailandia) (Seearunruangchai et al. 2004). Sin embargo, no se reportan investigaciones realizadas en arándanos en su estado natural, pero si se ha documentado su hallazgo en vinagres de arándanos obtenidos por fermentación espontánea a través del método Schützenbach (Hidalgo et al. 2013). Esta especie siempre ha estado relacionada con la producción tradicional de vinagre de vino (Vegas et al. 2010), pero también ha sido identificada en vinagre de cereales (Wu et al. 2010), vinagre de arroz (Haruta et al. 2006; Nanda et al. 2001; Tokunaga et al. 2009) y en el aceto balsámico tradicional (De Vero et al. 2006; Gullo et al. 2006; Gullo et al. 2009). Además, recientemente, *A. pasteurianus* ha sido aislada a partir de fermentaciones de cacao, en Costa de Marfil (Soumahoro et al. 2015). De acuerdo a lo dicho anteriormente y a lo largo de los capítulos de este trabajo de Tesis, los aislados clasificados en esta especie se podrían utilizar para la elaboración de vinagres de frutas, sobre todo los aislados A210 y C1, que fueron los que presentaron la más altas velocidades de acetificación. Por lo tanto, el uso de estas bacterias en forma de cultivo puro o mixto podría abrir nuevas líneas de investigación, en mostos alcohólicos de frutas (arándanos y frutas cítricas), para evaluar su comportamiento frente a estos sustratos.

A. syzygii fue aislada e identificada por primera vez a partir de jugo de manzanas en la ciudad de Bogor, Indonesia (Lisdiyanti et al. 2001). Tanasupawat (2009) la aisló a partir de frutas tropicales (sapote) en Bangkok (Tailandia). Barata et al. (2012), estudiando la microbiota presente en las uvas alteradas destinadas a vinificación y su influencia en las distintas etapas de la fermentación alcohólica, la encontró sólo a partir de uvas dañadas y no durante la vinificación. Posteriormente Hidalgo (2012), investigando BAA durante el proceso de elaboración de vinagre de caqui por método tradicional, en la ciudad

de Huelva (España), encontró además de las bacterias naturalmente presentes en este tipo de producto, *Acetobacter syzygii*. Además, ha sido aislada a partir de fermentaciones espontáneas de cacao en Ghana (Camu et al. 2007) y más recientemente a partir de vinagres de manzanas de distintas regiones de Turquía (Yetiman y Kesmen 2015). Aunque no se reportan vinagres elaborados con *A. syzygii* (en este estudio, esta especie está representada por el aislado C9 aislado del jugo fermentado de naranja), se la podría utilizar en dicho proceso ya que las pruebas de acetificación demuestran que la VA es suficientemente alta como para obtener un producto con un buen rendimiento.

A. tropicalis ha sido aislada por primera vez por Lisdiyanti et al. (2000) a partir de jugo de coco de Indonesia, y su nombre se debe a la zona tropical donde fue encontrada. Tres años más tarde, este mismo autor la aisló de vino de palma (Lisdiyanti et al. 2003). Posteriormente ha sido encontrada en vinagres de vinos obtenidos por fermentación espontánea en Austria (Silhavy y Mandl, 2006), Tanasupawat la aisló a partir de flores regionales de Tailandia (2009). Más tarde, Romero-Cortes et al. (2012) reportaron la presencia de *A. tropicalis* a partir de la fermentación del grano de cacao, según el método tradicional de la ciudad de Huimanguillo, en el estado mexicano de Tabasco, y evaluando el comportamiento de la misma frente a distintas concentraciones de etanol (4 a 10% v/v), encontraron que algunas de las cepas de *A. tropicalis* aisladas presentaban alta capacidad de acetificación, sobre todo cuando la concentración de etanol es de 4% v/v. Más recientemente, esta bacteria ha sido aislada de vinagres de manzana y de uva (Yetiman y Kesmen 2015). Si bien, por los antecedentes enumerados, se podría usar esta especie en la elaboración de vinagres, las pruebas de acetificación de los aislados clasificados en esta especie (A50 y A140) indicaron que las mismas no tienen una alta capacidad de acetificación, por lo que no sería recomendable su uso para dicho proceso, pues serían necesarios mayores tiempos de proceso y no se lograría un producto con las características deseadas.

En general, los miembros del género *Gluconobacter* se aíslan principalmente a partir de materiales azucarados, frutas, flores y alimentos

(Komagata et al. 2014). *G. frateurii* ha sido reclasificada en el año 1989 y debe su nombre al investigador Frateur (Mason y Claus 1989). Yamada et al. (1999) la encontró en flores y frutas de Indonesia, posteriormente, en un relevamiento de BAA de países tropicales (Indonesia, Tailandia y Filipinas) fueron aisladas de distintas fuentes: frutas, flores y alimentos fermentados (Lisdiyanti et al. 2003). Más tarde, fue aislada de flores y frutas de Tailandia (Vu et al. 2007), Tanasupawat (2009) la aisló a partir de frutas regionales de Tailandia, entre ellas manzanas y guayabas. En la amplia bibliografía consultada no se reporta el uso de *G. frateurii* para la elaboración de vinagres, sin embargo, las pruebas de acetificación realizadas con esta especie en este trabajo, sobre todo las observadas para el aislado A80, muestran una alta VA, por lo que sería muy interesante e innovador realizar vinagres de frutas con esta especie.

De acuerdo a lo expuesto, se posibilita la apertura a distintas alternativas de investigación para continuar con el trabajo que dio origen a la presente Tesis Doctoral.

7.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., Counil, F., Lozniewski, A. y Marchandin, H. (2010). *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 3935–3942.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 152–61.
- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M. y Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(2), 220–9.

- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–24.
- Castro, C., Cleenwerck, I., Trcek, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J. y Gañán, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 1119–25.
- Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1647–52.
- Cleenwerck, I. y De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2–14.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. y Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1551–1558.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S. y Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*, 23(8), 809–813.
- Euzéby, J. P. (1987). LPSN bacterio.net. [sitio web] [Consulta: 28 julio 2015]. Disponible en: <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>

- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E. y Sly, L. I. (1999). Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), 1681–1693.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., Wang, E., Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellano, J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1305–1314.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 295–304.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. y Guillamon, J. M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 853–860.
- González, A. y Mas, A. (2011). Differentiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 217–22.
- González, Á. (2005). *Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–12.

- Gullo, M., De Vero, L. y Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2585–9.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. y Yari Khosroushahi, A. (2015). Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International Journal of Food Science y Technology*, 50(4), 1056–1064.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R. y Khosroushahi, A. Y. (2015). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 690–697.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M. y Igarashi, Y. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 79–87.
- Hidalgo, C., García, D., Romero, J., Mas, A., Torija, M. J. y Mateo, E. (2013). *Acetobacter* strains isolated during the acetification of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) wine. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 227–232.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A. y Torija, M. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiology*, 30(1), 98–104.
- Iino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. y Uchimura, T. (2012). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 235–243.

- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 559–563.
- Katsura, K., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2002). *Gluconobacter asaii* Mason and Claus 1989 is a junior subjective synonym of *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1635–1640.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. y Swings, J. (2006). The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes*, 5, 163–200.
- Komagata, K., Iino, T. y Yamada, Y. (2014). The Family *Acetobacteraceae*. In E. R. et al. (Ed.), *The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (545–577). Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2003). Diversity of Acetic Acid Bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 91–99.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov. and *Acetobacter estun*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(3), 147–165.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter*

cibinongensis sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 47(3), 119–131.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y. y Uchimura, T. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Food Science y Technology*, 52, 813–818.

Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Thi Lan Vu, H., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Tanasupawat, S., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2013). *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 375–384.

Malimas, T., Yukphan, P., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2009). *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55, 247–254.

Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2008). Full Paper *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54, 211–220.

Mason, L. M. y Claus, W. (1989). Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurii* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39 (174-184).

- Moonmangmee, D., Taloadtaisong, Rangsan Saowaro, S., Moonmangmee, S. y Tanasupawat, S. (2003). Vinegar making from Thai traditional alcoholic beverage, satoh. In *KMUTT annual research abstracts* (p. 113). Bangkok. Thailand: ISBN 974-456-528-4. Retrieved from WWW.agriqua.doae.go.th/.../P_2_Duangtip.pdf
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H. y Murooka, Y. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 986–990.
- Navarro, D., Mateo, E., Torija, M. y Mas, A. (2013). Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s), 19–23.
- Ndoye, B., Cleenwerck, I., Destain, J., Guiro, A. y Thonart, P. (2009). Preservation of vinegar acetic acid bacteria. In L. Solieri y P. Giudicci (Eds.), *Vinegars of the World* (pp. 61–71). Milán, Italia: Springer-Verlag Italia, Italia.
- Poblet, M., Rozes, N., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 63–67.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A. y Romero, J. (2007). Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 348–55.
- Romero-Cortes, T., Robles-Olera, V., Rodriguez-Jimenes, G. y Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 339–347.

- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*, 1981–1987.
- Schuller, G., Hertel, C. y Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(6), 2013–2020.
- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T. y Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *50*(1), 47–53.
- Sengun, I. Y. y Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, *22*(5), 647–656.
- Silhavy, K. y Mandl, K. (2006). *Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria. *Mitteilungen Klosterneuburg*, *56*, 102–107.
- Slapsak, N., Cleenwerck, I., De Vos, P. y Trček, J. (2013). *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*, 17–21.
- Sokollek, S., Hertel, C. y Hammes, W. (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*, 935–940.
- Solieri, L. y Giudicci, P. (2009). *Vinegars of the World*. (L. Solieri y P. Giudicci, Eds.) *Vinegars of the World*. Milán, Italia: Springer-Verlag Italia, Italia.

- Soumahoro, S., Ouattara, H. G., Goualié, B. G., Koua, G., Doue, G. y Niamke, S. L. (2015). Occurrence of high acetic acid-producing bacteria in Ivorian cocoa fermentation and analysis of their response to fermentative stress. *American Journal of BioScience*, 3(3), 70–79.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Malimas, T., Yukphan, P., Nakagawa, Y. y Yamada, Y. (2009). Identification of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Asaia* strains isolated in Thailand based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer restriction and 16S rRNA gene sequence analyses. *Microbes and Environments*, 24(2), 135–143.
- Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O. y Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 159–167.
- Tokunaga, H., Tanaka, H., Hashiguchi, K., Nagano, M., Arakawa, T. y Tokunaga, M. (2009). Rapid detection of acetic acid bacteria in the traditional pot-Fermented rice vinegar Kurozu. *Food Science and Technology Research*, 15(6), 587–590.
- Trček, J. y Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 137–144.
- Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J. M., Poblet, M., Torija, M. y Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 130–136.
- Vegas Pérez, C. A. (2011). *Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino*

- tradicional*. Tesis Doctoral. Departament de Bioquímica I Biotecnologia. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira I Virgili.
- Vu, H. T. L., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Muramatsu, Y., Thi Tu Bui, U., Tanasupawat, S., Duong, K., Nakagawa, Y., Thanh-Pham, H. y Yamada, Y. (2013). *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov. sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59, 153–166.
- Vu, T. L. H., Malimas, T., Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Thanh Loan, L., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2007). Identification of Thai isolates assigned to the genus *Gluconobacter* based on 16S-23S rDNA ITS restriction analysis. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 133–142.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F. y Giudici, P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current Microbiology*, 60(4), 280-286.
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* com. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2225–2227.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. y Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 23–28.
- Yamada, Y. y Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15-24.

Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D. y Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849–859.

Yetiman, A. E. y Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 9–16.

Yukphan, P., Malimas, T. M., Muramatsu, Y. M., Takahashi, M. T., Kaneyasu, M. K., Tanasupawat, S. T., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Potacharoen, W. y Yamada, Y. (2008). *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 672–676.

Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2011). *Neokomagataea* gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., osmotolerant acetic acid bacteria of the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(3), 419–426.

Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., y Yamada, Y. (2005). *Neoasaia Chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 301–311.

Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2004). *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 235–242.

Yukphan, P. Y., Malimas, T. M., Muramatsu, Y. M., Takahashi, M. T., Kaneyasu, M. K., Potacharoen, W. P., Tanasupawat, S. T., Nakagawa, Y. N. Hamana, K. H., Tahara, Y. T., Tanticharoen, M. T. y Yamada, Y. Y. (2009). *Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(10), 2156–2162.