
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.