

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