



RESISTENCIA AL ETANOL DE BACTERIAS LÁCTICAS ENOLÓGICAS; FORMACIÓN DE BIOFILM Y ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LA NISINA



Rocío Fernández^{*1}, Miriam González¹, Mohamed Reda¹, Carmen Tenorio¹ y Fernanda Ruiz-Larrea¹

¹Universidad de La Rioja. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV, CSIC-UR-GR). Av. Madre de Dios 51, 26006 Logroño (La Rioja).
e.mail: fernanda.ruiz@unirioja.es

Introducción

El control del crecimiento de las bacterias lácticas (BAL) es imprescindible para obtener vinos de calidad. La formación de biofilm aumenta la resistencia bacteriana a condiciones de estrés ambiental [1] y a los agentes antimicrobianos [2] proporcionándoles una ventaja para su supervivencia. El objetivo de este trabajo es el estudio de la producción de biofilm en cepas enológicas de las especies *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* y su comportamiento frente al etanol y al antimicrobiano nisina.

Material y métodos

Cepas estudiadas: 69 cepas BAL de origen enológico: 11 *Leuconostoc mesenteroides*, 2 *Pediococcus acidilactici*, 1 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus brevis*, 2 *Lactobacillus paracasei*, 2 *Lactobacillus hilgardii*, 2 *Pediococcus parvulus*, 36 *Lactobacillus plantarum* y 12 *Oenococcus oeni*. Se determinó el crecimiento bacteriano mediante recuentos de UFC/ml en MRS agar, y se determinó su capacidad de formar biofilm mediante el método de tinción con cristal violeta [3] modificado.

Método para la cuantificación de biofilm: Las cepas se cultivaron en tubos de cristal con BHI durante 48 horas a 30°C y con 5 % CO₂. Se analizaron por triplicado y se cuantificó el biofilm mediante tinción con cristal violeta considerándose como análisis positivo una absorbancia a 600 nm mayor o igual a 1.

Formación de biofilm en presencia de etanol y de nisina en el medio de cultivo: Las cuatro cepas que resultaron positivas para la formación de biofilm (Tabla 1) se cultivaron en BHI con: 0%, 2%, 4%, 6%, 8% y 12% (v/v) de etanol a 23-25°C durante 48 horas sin agitación. De forma análoga, se realizó el estudio en el medio BHI suplementado con 6 µg/ml de nisina y concentraciones de etanol de 0%, 2%, 4%, 6%, y 8%. Se estudió la tolerancia al etanol del biofilm previamente formado cultivando las cepas en BHI durante 48 horas, eliminando el sobrenadante y añadiendo sobre el biofilm formado, BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12% de etanol. Tras otra incubación de 24 horas en iguales condiciones, se cuantificó el biofilm formado.

Tabla 1. Cepas de bacterias lácticas formadoras de biofilm estudiadas.

Nombre de la cepa	Especie	Origen
J32	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Uva
J39	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Vino
J57	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Vino
IS151	<i>Oenococcus oeni</i>	Vino

Imágenes de microscopía de fluorescencia de un biofilm:

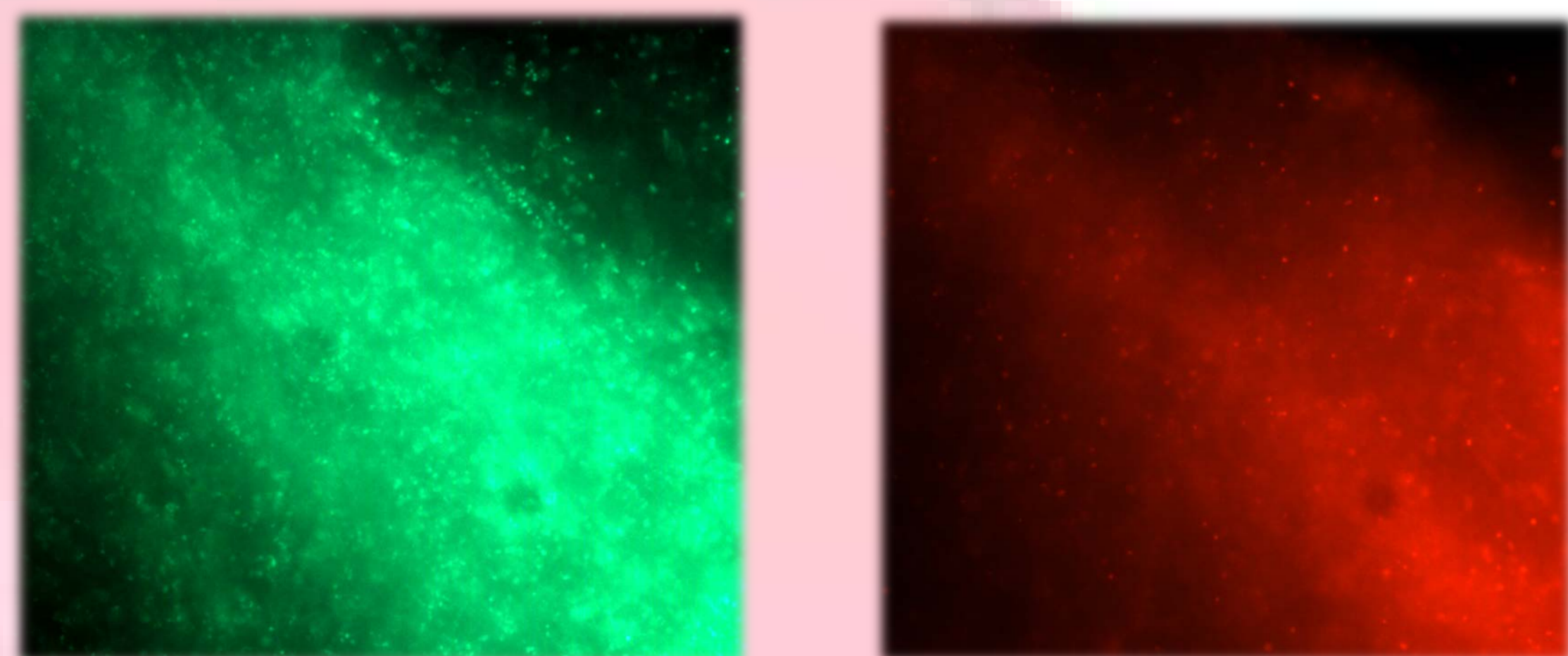


Figura 1: Imagen de microscopía de fluorescencia (630x) de un fragmento de biofilm de J32 formado en BHI [células rojas no viables teñidas con yoduro de propidio y células verdes teñidas con SYTO 9 (LIVE/DEAD BacLight Invitrogen kit)].

Bibliografía

- [1] Kubota, H., Shouko S., Nobuhiko N., Hajime T. & Hiroo U. 2008. J. Biosci Bioeng 106, n^o4, 381-386.
[2] Heiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. 2010. Int J Antimicrob Ag 35(4):322-32.
[3] O'Toole G A & Kolter R. 1998. Mol Microbiol 28: 449-461
[4] Fernández-Pérez, R.; Torres, C.; Sanz, S. y Ruiz-Larrea, F. 2010. Eur Food Res Technol 231: 813-819.
[5] Rojo-Bezares, B.; Sáenz, V.; Zarazaga, M., Torres, C. & Ruiz-Larrea, F. 2007. Int J Food Microbiol 116, 32-36.

Agradecimientos:

Este trabajo se ha desarrollado con la ayuda del proyecto AGL2010-15466 del MCINN y FEDER. Rocío Fernández recibe una beca FPI de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Resultados

Del total de 69 cepas de BAL enológicas estudiadas sólo 4 fueron capaces de formar biofilm (*Le. mesenteroides* J32, *Le. mesenteroides* J57, *Lb. plantarum* J39 y *O. oeni* IS151). La cepa J32 fue la que mayor capacidad de formación de biofilm presentó en condiciones estándar (ausencia de etanol). Estas cepas fueron capaces de formar biofilm en presencia de hasta un 6% de etanol en el medio (Fig.2, histogramas de color sólido). A mayor concentración de etanol, las cepas presentaban una menor capacidad de formar biofilm, desapareciendo con una concentración de 6 a 12% de etanol. Cuando se añadió medio fresco con etanol sobre un biofilm previamente formado (histogramas rayados) la respuesta fue en todos los casos un aumento del biofilm conforme mayor era la concentración de etanol en el medio adicionado (máxima formación de biofilm entre 6 y 10% de etanol).

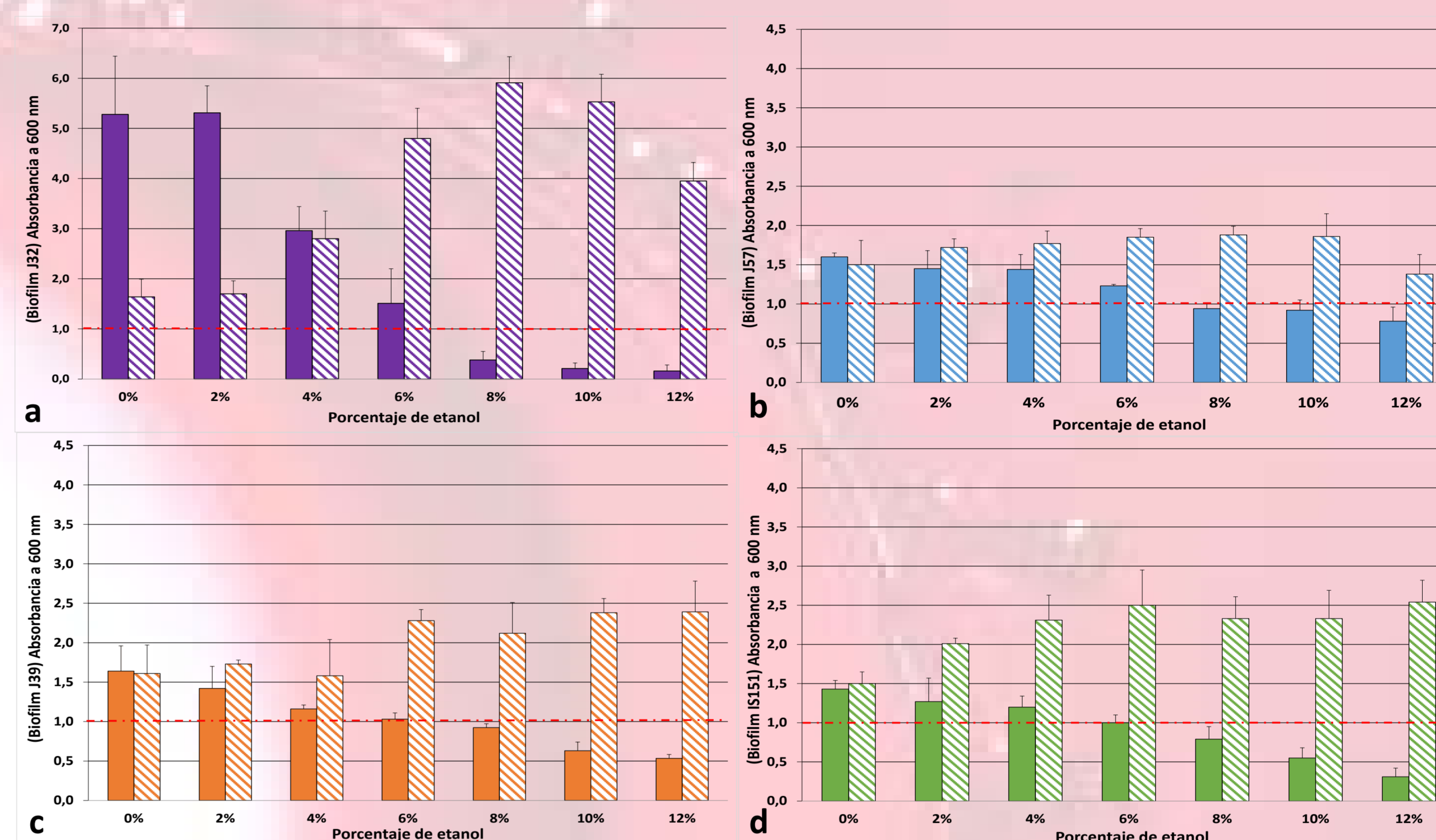


Figura 2. Biofilm formado por las cepas *Le. mesenteroides* (J32 a y J57 b), *Lb. plantarum* (J39 c) y *O. oeni* (IS151 d) en las siguientes condiciones:

■ En presencia de etanol en el medio ▨ Adicionando etanol sobre biofilm previamente formado.

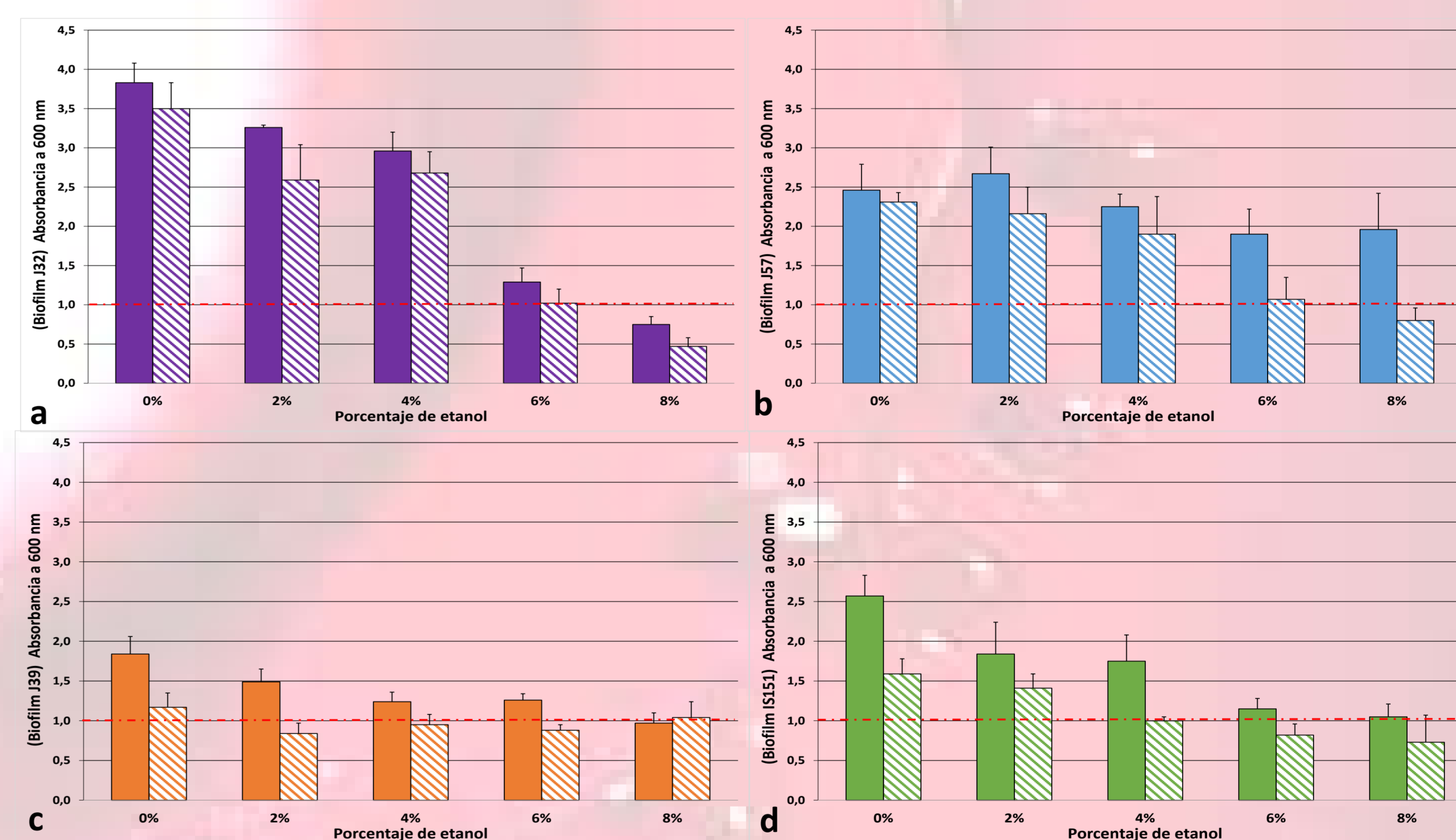


Figura 3. Biofilm formado tras 48 horas de incubación de las cepas *Le. mesenteroides* (J32 a y J57 b), *Lb. plantarum* (J39 c) y *O. oeni* (IS151 d) en las siguientes condiciones:

■ En ausencia de nisina; ▨ En presencia de 6 µg/ml de nisina.

Le. mesenteroides J32 no resultó sensible a la nisina en las condiciones ensayadas y fue la cepa que mayor cantidad de biofilm produjo, tanto en presencia como en ausencia de nisina (Fig.3a). Esta cepa había sido aislada de uva. Para la cepa *Le. mesenteroides* J57 la nisina con una concentración de 6 µg/ml disminuyó la población de células planctónicas a la mitad [5]. La Fig.3b muestra que la nisina también disminuyó la cantidad de biofilm, y evitó la formación de éste cuando en el medio había 8% de etanol.

Respecto a *Lb. plantarum* J39, la nisina presentó efecto inhibitorio de su crecimiento y una concentración de 6 µg/ml evitó totalmente la formación de biofilm cuando en el medio estaba presente el etanol (Fig.3c).

Para la cepa *O. oeni* IS151 la nisina presentó efecto inhibitorio de su crecimiento y una concentración de 6 µg/ml de nisina disminuyó la formación de biofilm, y evitó su formación cuando en el medio había etanol a partir de un 6% (Fig.3d).

Conclusión

Las células bacterianas formando un biofilm presentan una mayor resistencia al etanol que cuando se encuentran en forma planctónica, y la presencia de nisina disminuye la capacidad de formar biofilm de las cepas BAL sensibles a este antimicrobiano.