

Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación

Quando el vino
sabe a vinagre

Igor Hernández y
Francisca Barbero
Departamento Técnico
Guserbiot, S.L.

Las bacterias acéticas son un grupo de microorganismos presentes de forma natural en el mosto y que pueden causar problemas durante la elaboración y el envejecimiento del vino. En este artículo, se describe brevemente su metabolismo y su ecología en las bodegas, aportando datos sobre su evolución durante la vinificación. Igualmente, se comparan las técnicas utilizadas en los laboratorios para su detección y cuáles son las limitaciones de los diferentes métodos. Finalmente, se analizan las estrategias desarrolladas para su eliminación de las bodegas y se dan una serie de recomendaciones para su control.

Seguramente, el ser humano descubrió el vinagre en un depósito de vino mal cuidado ya que, al igual que la fermentación alcohólica, el avinagrado del vino sucede de forma espontánea. Si las levaduras son las responsables del paso de mosto a vino, las bacterias acéticas (BA) son las responsables del paso de vino a vinagre. En las siguientes páginas, vamos a centrarnos en las bacterias acéticas como contaminantes durante la elaboración, siendo las responsables de una de las peores “enfermedades” del vino, el picado acético. Esta alteración es un proceso que no puede volver atrás, que es difícil de detener y que puede echar a perder definitivamente el vino.

Clasificación y características de las bacterias acéticas

La clasificación de las bacterias acéticas ha variado enormemente en los últimos tiempos.

En la actualidad, bajo este nombre se conoce un grupo de bacterias pertene-

cientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia*, *Granulibacter* y *Saccharibacter* (Yamada y Yukphan, 2008). Sin embargo, esta clasificación está en constante revisión.

Al microscopio, las bacterias acéticas (BA) son Gram negativas, de entre 0,4 y 4,5 μm de largas y entre 0,4-1 μm de anchas, con forma elipsoidal y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. Presentan flagelos de forma peritroca o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia.

Este grupo de microorganismos necesita del oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que tienen un metabolismo aerobio obligado. Generalmente, las BA son catalasa positivas, oxidasa negativas y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono. El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, si bien puede llegar a crecer a pH cercanos a 3.

Dentro del mundo enológico, las especies más conocidas son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans*. Otras especies que también han sido asociadas a las uvas y

El avinagrado del vino, que es un fenómeno espontáneo y natural, se origina por la proliferación de bacterias acéticas

al mosto son *Gluconacetobacter liquefaciens* y *Gluconacetobacter hansenii* (Du Toit y Lambrechts 2002; Du Toit y Pretorius 2002).

Su metabolismo y las consecuencias sobre el mosto y el vino

Las BA son metabólicamente activas desde el momento en el que la uva está en el campo hasta que el vino llega al consumidor, generando una serie de compuestos no deseados que tendrán consecuencias en la calidad del producto final. En un proceso que se da sobre todo en

EN SÍNTESIS...

1. Las bacterias acéticas están presentes de forma natural en la uva, pueden soportar las condiciones de vinificación y llegan a la guarda del vino con un metabolismo activo
2. Estas bacterias son grandes productoras de ácido acético y acetaldehído, elevando la acidez volátil del vino y llegando al picado acético
3. Las bacterias acéticas necesitan de oxígeno para crecer. Los procesos que oxigenan el vino favorecen el crecimiento y el metabolismo de estas bacterias
4. Existen medios de cultivo específicos y técnicas moleculares para detectar, aislar e identificar las bacterias acéticas presentes en el vino
5. La clave para evitar el picado acético es la prevención. Ésta se basa en la limpieza de las instalaciones, en el manejo apropiado del mosto, en la vinificación correcta y en el embotellado adecuado

las bayas, las bacterias acéticas pueden convertir la glucosa y fructosa en ácido glucónico y oxofruktosa, respectivamente. De igual manera, las BA pueden metabolizar algunas hexosas como manitol, manosa o ribosa.

Además, y en asociación con las levaduras de la uva, pueden producir ácido acético y acetaldehído, lo que incrementa la acidez volátil del mosto. La acumulación de estos metabolitos suele depender de la cepa, del estado de la uva y de la concentración de los diferentes azúcares. Al igual que en el caso de las levaduras, la población de BA es mayor cuando la uva está dañada, ya que las bacterias pueden acceder fácilmente al interior de la uva, rica en nutrientes.

En la bodega, la consecuencia más conocida de la actividad de las BA es el picado acético del vino. Este proceso se caracteriza por la oxidación del etanol en ácido acético, lo que puede elevar la aci-



Las bacterias acéticas pueden acceder fácilmente al interior de la uva, cuando ésta está dañada

dez volátil del vino hasta valores de 0,8 g acético/l.

Esto tiene consecuencias organolépticas de sobra conocidas por todos los enólogos.

La velocidad de este proceso está determinada por la especie, la cantidad de BA presentes en el vino y por las características del vino.

En las BA, esta ruta metabólica se favorece cuando la concentración de oxígeno es baja.

El acetaldehído es un metabolito intermedio en la ruta hacia el ácido acético que se puede encontrar libre en el medio. La concentración de este compuesto varía mucho entre los diferentes tipos de vinos, pero puede llegar a valores de 200 mg/l. Como norma general, podemos decir que se produce acetaldehído cuando hay poco oxígeno disuelto en el medio y cuando la concentración de etanol es alta; justo las condiciones que se dan en el vino. Sensorialmente, el acetaldehído da un carácter oxidado al vino a partir de 50 mg/l.

Por otro lado, las BA pueden utilizar el glicerol como fuente de carbono, generando principalmente dihidroxiacetona. De esta manera, se reduce en el vino la concentración de glicerol obtenido durante la fermentación alcohólica. También se pueden incrementar los niveles de acetato de etilo y de acetoina, lo que aporta al vino aromas similares a la mantequilla.

Además de sus efectos negativos en el sabor, algunos compuestos resultantes del metabolismo de las BA, como la dihidroxiacetona, el acetaldehído y la 5-oxofruktosa, actuarían como compuestos quelantes (secuestrantes) del SO_2 , bajando la concentración de SO_2 libre en el medio y reduciendo la acción antimicrobiana y antioxidante de este aditivo. Las bacterias del género *Gluconobacter* son grandes productoras de este tipo de compuestos (Barbe y cols., 2001).

Por último, algunas BA son capaces de liberar en el vino cadenas de polisacáridos, lo que incrementa su viscosidad y dificulta los procesos de clarificación y filtración del mosto y del vino.

Evolución en el vino

Las bacterias acéticas representan, como media, más del 68% del total de bacterias presentes en la uva en el momento de la recogida, dependiendo del estado sanitario de ésta (Barbe y cols., 2001). Se han descrito niveles de 3×10^3 CFU/ml en uvas sanas y de hasta 5×10^6 CFU/ml en uvas atacadas por *Botrytis cinerea* (González y cols., 2004; Barbe y cols., 2001; Joyeux y cols., 1984). Los diversos investigadores no se ponen de acuerdo sobre la evolución de la población los primeros días de la vinificación. Para González y cols. (2004), el número de BA crecía durante los primeros momentos de la vinificación, mientras que para

	CFU/ml
Mosto	16.000
Fermentación alcohólica	
Tras 3 días	3.000
Tras 7 días	100
En el día 10	
Antes del trasiego	20
Tras el trasiego	30.000
Fermentación maloláctica	
Al comienzo	400
Al final (3 meses)	120
Envejecimiento en bodega	
Tras 4 meses	160
Tras 6 meses	900
Tras 9 meses	600
Tras 11 meses	600

TABLA 1. Evolución de la población de bacterias ácido acéticas durante la elaboración de vino tinto (adaptado de Joyeux y cols., 1984)

Ni el pH del vino ni las concentraciones de dióxido de azufre, que se utilizan habitualmente en bodega, impiden la proliferación de las bacterias acéticas en el proceso de elaboración

Joyeux y cols. (1984) este descendería (Ver tabla 1). Sin embargo, ambas investigaciones coinciden en que la población desciende drásticamente durante la fermentación alcohólica. Finalmente, la población se mantendría estable y por debajo de los 1.000 CFU/ml a lo largo de la fermentación maloláctica y la crianza en bodega.

Ya hemos comentado que las BA son aerobias obligadas, por lo que necesitan oxígeno en el medio para su crecimiento y su actividad metabólica. Durante la fermentación alcohólica, el oxígeno presente en el mosto se agota rápidamente,

La velocidad del proceso de picado acético está determinada por diversos factores como son: la especie, la cantidad de BA presentes en el vino y las características específicas del caldo

lo que mantiene la población de BA bajo control. Sin embargo, cualquier tratamiento que incluya agitación u oxigenación favorecerá el crecimiento de las BA. En la tabla 1, hay un ejemplo del efecto de las operaciones de vinificación sobre la población de bacterias acéticas. Tras el trasiego, cuando el vino se oxigena, se observa que el número de células capaces de formar colonias se multiplicó por 1.000. Al comenzar la fermentación maloláctica pueden superar 105 CFU/ml, lo que conlleva un incremento de la concentración de ácido acético (González y cols., 2005). Datos similares se han obtenido en experimentos a escala de laboratorio (Joyeux y cols., 1984). Respecto a la guarda, los mismos autores han propuesto que la tasa de penetración del oxígeno en la bodega (unos 30 mg/l por año) es suficiente para mantener poblaciones pequeñas de bacterias acéticas.

La especie de BA mayoritaria varía a lo largo de la vinificación. En las uvas sanas la población inicial estaría compuesta fundamentalmente por *G. oxydans*, mientras que las uvas con botrytis también acogen cepas de *A. aceti* y *A. pasteurianus* (González y cols., 2005; Joyeux y cols., 1984). En el mosto, al principio de la fermentación, predominan cepas de *G. oxydans*, pero desaparece tras la fermentación alcohólica debido a la poca resistencia al etanol de esta bacteria (González y cols., 2004; Drysdale y Fleet, 1989). Al final de la fermentación

están presentes cepas de *A. aceti* y de *A. pasteurianus*, ya que presentan gran resistencia al etanol y a las condiciones de microaerobiosis.

Métodos de detección

Algunos de los medios de crecimiento utilizados para la detección de las bacterias acéticas han sido el medio GYC, el medio Manitol o el medio Agar carbonato que aparece en la figura 1. Sin embargo, la detección clásica de bacterias acéticas puede presentar inconvenientes, sobre todo en muestras procedentes de vinagres. Cuando Bartwosky y cols. (2003) intentaron aislar bacterias acéticas a partir de vino embotellado, comprobaron que no crecían en los medios generales para bacterias. Es por ello que se han desarrollado técnicas de doble capa de agar en el medio, y medios que incluyen agar y ácido acético (Entani y cols., 1985).

Hasta hace poco tiempo, la clasificación de las bacterias acéticas se hacía en función de características fenotípicas, como la apariencia y la fisiología. Sin embargo, estas características pueden variar entre cepas de la misma especie de BA, lo que complica las identificaciones y obliga a realizar muchas pruebas. En la actualidad, muchas de las especies bacterianas se clasifican de acuerdo a la secuencia del gen 16S. Este gen se encuentra presente en el DNA de las bacterias, siendo ésta una región conservada dentro de cada especie. Otras zonas que se suelen estudiar son las comprendidas entre los genes 16S-23S.

Dentro de las bacterias acéticas, se da una situación especial. El gen 16S es una zona muy conservada a nivel de familia, lo que permite la identificación de las BA para Poblet y cols. (2000) y para Ruiz y cols. (2000), mientras que sería una zona excesivamente conservada para Trcek y cols. (2002). Sin embargo, la zona 16S-23S presenta una secuencia muy variable, demasiado variable para Ruiz y cols. (2000) y apropiada para Trcek y cols. (2002).

Otros genes como el gen *adhA*, también han sido investigados como posibles objetivos para discriminar las especies, si bien no han mejorado los resultados obtenidos con los fragmentos 16S-23S (Trcek, 2005). Recientemente, se han desarrollado métodos de real-time PCR para cuantificar BA que, según los investigadores, pueden detectar niveles de 10

Eliminación de las bacterias acéticas

células/ml (Gammon y cols., 2007; González y cols., 2007).

Estas investigaciones han permitido a los laboratorios de análisis desarrollar técnicas de detección e identificación rápida para las bacterias acéticas presentes en el vino, ayudando a los enólogos a evaluar el riesgo de picado acético de sus vinos.

Prevención BA

Tal y como hemos visto, las condiciones que se dan en el vino no impiden el desarrollo de las BA.

Estas bacterias soportan altas concentraciones de etanol, crecen bien en un rango entre 18 y 30 °C, tienen actividad metabólica a partir de 10 °C, y ni el pH del vino ni las concentraciones de SO₂ habitualmente utilizadas en bodega impiden su crecimiento.

A nivel industrial, resulta prácticamente imposible eliminar las BA de una bodega, y mucho menos de la uva. Pero podemos frenar su proliferación hasta niveles peligrosos, evitando las consecuencias negativas para el vino.

Los puntos clave para tener bajo control la actividad de las BA serían:

– **El oxígeno.** Este es el auténtico factor limitante del crecimiento. La falta de oxígeno no elimina las bacterias, pero impide su crecimiento y reduce mucho su metabolismo. Así pues, el riesgo de contaminación crece con los tratamientos que oxigenan el vino, los que retrasan la fermentación y los que permiten al mosto entrar en contacto con el aire. Por eso, se antoja clave iniciar la fermentación alcohólica con prontitud, terminarla de forma correcta y ser cuidadoso con los tratamientos que recibe el vino durante la fermentación y la guarda.

– **La limpieza y desinfección de las instalaciones,** incluyendo maquinaria, depósitos, barricas, botellas y demás elementos de las bodegas. De esta manera, reduciremos la población inicial y la presencia de cepas resistentes. Este proceso es más difícil en las superficies porosas, como pueden ser el interior de las barricas.

– **Las uvas suelen estar contaminadas con BA.** Sin embargo, la población es mayor en uva dañada que en uva sana, por lo que la utilización de uva en buenas condiciones higiénicas permite reducir los niveles iniciales de BA.

– **Se deben vigilar los niveles de azúcar** residual en los vinos, ya que es mucho más fácil que aparezcan las bacterias alteran-

tes en vinos con azúcares residuales altos. Junto con la obtención de un vino “seco”, el uso adecuado del SO₂ puede ayudarnos a la estabilización microbiológica de los vinos.

– **El embotellado** es uno de los puntos clave para evitar el crecimiento de bacterias acéticas durante el envejecimiento del vino ya que la transmisión de oxígeno, y con ello la actividad de las bacterias acéticas, va a depender del tipo de material en el que envasamos nuestro vino. Así pues, el uso de materiales plásticos (PET o formatos tipo Bag-in-box) se ha visto limitado por su alta transmisión de oxígeno a través de este material, si bien se está trabajando para mejorar este aspecto.

– **El tipo de corcho** que utilizamos es un punto crítico en el embotellado. El corcho natural presenta unos niveles bajos de porosidad frente al oxígeno, lo que favorece la conservación del vino. Los corchos “sintéticos” suelen presentar unos niveles superiores de transmisión de oxígeno, si bien las empresas productoras han trabajado intensamente en este sentido y según sus propias palabras, en los productos de alta gama “la permeabilidad al oxígeno es comparable con la del corcho natural de alto grado”. Bartowsky y cols. (2003) especulan sobre un efecto protector de la caperuza de metal que recubre el corcho, ya que éste actuaría como barrera del oxígeno, retrasando el crecimiento y el metabolismo de las bacterias acéticas. Sin embargo, este experimento debe ser repetido con un mayor número de muestras antes de poder aseverar este efecto protector.

– **El almacenamiento y el transporte.** Un espacio excesivo entre el corcho y el vino, tras el embotellado, puede permitir la actividad de las bacterias acéticas. Así mismo, almacenar la botella verticalmente y con el tapón hacia arriba, o almacenarla a temperaturas inadecuadas, puede favorecer el picado del vino. Diversas investigaciones apuntan a que las BA son muy poco activas a temperaturas por debajo de 10 °C.

Una vez que ha comenzado, el picado acético es muy difícil de solucionar.

En el caso de que la contaminación se encuentre en una fase inicial, se puede intentar una filtración esterilizante, seguido de una sulfitación adecuada y la guarda del vino en botellas perfectamente limpias. Si la contaminación está en un gra-



FIGURA 1. A. aceti creciendo en una placa de Agar carbonato. Obsérvese el halo característico alrededor de la zona de crecimiento

Para evitar el picado acético, hay que prestar atención a la higiene en las bodegas, a los tratamientos que oxigenan el vino y a las condiciones de anoxia



Además de su mal sabor en el vino, algunas BA dificultan los procesos de clarificación y filtración del mosto y del vino



El picado acético es un proceso que no puede volver atrás, que es difícil de detener y que puede echar a perder definitivamente el vino

do avanzado, donde la concentración de acético es alta y se percibe con facilidad, el vino es difícilmente recuperable y deberíamos pensar en destinarlo a la fabricación de vinagre o a la destilación.

Por último, nos gustaría llamar la atención sobre ciertas prácticas tecnológicas que se dan en el mundo del vino y que fa-

vorecen el crecimiento y la actividad de estas bacterias. Entre ellas, están la baja sulfitación del mosto, el abuso de los trasiegos, la falta de filtración, el uso de corchos sin la calidad suficiente, los retrasos en el rellenado de las cubas y todos los tratamientos que implican un retraso en la fermentación alcohólica o la oxigenación excesiva del vino. Un claro ejemplo es la aireación ya que, si bien esta práctica facilita el correcto desarrollo del color del vino, también posibilita el desarrollo de las bacterias acéticas. Es labor de cada enólogo analizar los pros y contras de estas prácticas de acuerdo al vino que quiere obtener, apoyándose en las técnicas actuales disponibles para detectar y cuantificar el desarrollo de las bacterias que pueden echar a perder un buen vino. **VITQ**

>> Referencia bibliográfica de autores

La bibliografía completa de este artículo puede ser solicitada en vinoteq@rbi.es

CONCLUSIONES

□ Nuestros vinos no están a salvo ni en las barricas ni en las botellas. Visto de forma general, las BA están presentes desde la recogida de la uva, pueden sobrevivir durante la vinificación y aguantan el embotellado y la guarda del vino. Pero contamos con la ventaja de que necesitan oxígeno para crecer.

□ Así pues, una correcta selección de la uva, un proceso de vinificación correcto y el cuidado durante el embotellado ayudarán a reducir la población inicial de bacterias acéticas e impedirán su crecimiento.

□ Para evitar el picado acético del vino, debemos prestar especial atención a la limpieza e higiene en nuestras bodegas, a los tratamientos que pueden oxigenar el vino y al mantenimiento de las condiciones de anoxia durante la vinificación. Al tratar con las BA, prevenir es primordial ya que curar es casi imposible.