

Figura 1. *Pediococcus damnosus*
visión de microscopio

Puede producir alteraciones como el ahilado del vino, amargor y olores desagradables

Pediococcus como bacteria alterante del vino

Pediococcus es uno de los géneros de bacterias lácticas considerado como potencialmente peligroso para la calidad del vino. Bajo determinadas condiciones *Pediococcus* puede producir alteraciones como el ahilado del vino, amargor, elevadas concentraciones de aminas biógenas o diferentes olores desagradables. Condiciones como un pH por encima de 3,5, un bajo contenido en sulfuroso, presencia de azúcares fermentables y temperaturas elevadas favorecen el crecimiento de este género de bacterias. El control de estos parámetros, además de mantener unas óptimas condiciones higiénicas en la bodega pueden prevenir las alteraciones que *Pediococcus* puede ocasionar.

Miren Zumárraga y Francisca Barbero
Departamento Enología de Guserbiot S.L.U.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las responsables de conducir la segunda fermentación o fermentación maloláctica (FML) del vino, en la que el ácido L-málico se descarboxila en ácido L-láctico y CO_2 , reduciendo la acidez y contribuyendo al aroma y sabor del producto final. *Oenococcus oeni* es la especie bacteriana predominante durante la FML, aunque bajo estas condiciones también pueden crecer y contribuir en la fermentación diferentes especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Esta última bacteria es la responsable de diferentes alteraciones en el vino, por lo que una FML descontrolada y unas malas prácticas de higiene y desinfección en la bodega pueden suponer un problema.

El género *Pediococcus* fue descrito por Claussen en 1903 y de todas las especies descritas en la actualidad,

Una fermentación maloláctica descontrolada y unas malas prácticas de higiene y desinfección en la bodega pueden suponer un problema

cuatro han sido aisladas a partir de vino: *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus*, siendo estas dos últimas especies las más frecuentes en este medio.

Morfología y características fisiológicas

Pediococcus es un género de bacterias del ácido láctico Gram positivas, no-motiles y catalasa negativas, pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae*. Son

bacterias microaerófilas o anaeróbicas facultativas y homofermentativas, es decir, convierten la glucosa en ácido láctico sin la producción de CO_2 .

Morfológicamente son células esféricas y normalmente se presentan en pares, o tétradas, siendo las únicas BAL con forma de coco que se dividen a lo largo de dos planos de simetría (ver figura 1). El tamaño celular varía de 0,6-1,0 μm dependiendo de las cepas, mientras que en medios de cultivo sólidos las colonias tienen entre 1 y 2,5 mm de diámetro, son lisas, redondas y de color blanco-grisáceo.

Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 40 °C, aunque algunas especies pueden crecer a temperaturas superiores a 50 °C. Muchos *Pediococcus* pueden distinguirse del resto de bacterias lácticas por su tolerancia a ambientes altamente ácidos

(pH 4,2) y con elevadas concentraciones de sal (6,5% NaCl).

Evolución durante la vinificación

La vinificación es un proceso microbiológico complejo que implica la participación tanto de levaduras como de bacterias. Ambas aparecen naturalmente en los hollejos de las uvas, pero también es inevitable encontrarlas en los depósitos, barricas y todo el equipamiento utiliza-

do en bodega. Uno de los factores más importantes en el crecimiento de *Pediococcus* en el vino, es el pH. Un pH superior a 3,5 favorece el crecimiento y por lo tanto la contaminación por *Pediococcus* y el resto de BAL.

Pediococcus se puede encontrar en el suelo, en la superficie de las uvas y en las hojas y entrar en la bodega durante la vendimia. La población en la uva generalmente es baja y depende de los niveles de maduración. Otra fuente de contaminación dentro de la bodega es el propio equipamiento, desde las bombas, líneas y válvulas hasta los depósitos de almacenamiento. Las barricas de madera donde se ha llevado a cabo la FML, a menudo son muy difíciles de limpiar y desinfectar, y por lo tanto también pueden ser reservorios de estas bacterias.

En condiciones de vinificación normales, terminada la fermentación alcohólica, la población de BAL permanece estacionaria durante 10 ó 15 días, conocida como "fase de latencia". Las bacterias mejor adaptadas a este medio alcohólico y ácido, como *Oenococcus oeni* o *Pediococcus* (en los vinos menos ácidos) comienzan a multiplicarse exponencialmente hasta alcanzar una población del orden de 10⁶ células por ml, desarrollándose entonces la FML. Después de la FML la supervivencia de las BAL dependerá de las condiciones del medio, donde destaca el valor de pH, el contenido en etanol, y sobre todo el anhídrido sulfuroso como principal bactericida. *Oenococcus oeni* desaparece rápida-

ALTERACIÓN	COMPUESTO	PREVENCIÓN y/o TRATAMIENTO
Olor a mantequilla	diacetilo	Tratar con SO ₂ y bajar la temperatura
Amargor	acroleina	Tratar con SO ₂
Ahilado del vino	polisacáridos (β -glucanos)	Agitación mecánica violenta, filtración y SO ₂
Aminas biógenas	histamina, putrescina, cadaverina	Evitar elevadas concentraciones de aminoácidos y proteínas
Olor a geranio	2-etoxyhexa-3,5-dieno	Cuidado con el tratamiento con ácido sórbico

Alteraciones producidas por *Pediococcus* en el vino

mente una vez acabada la FML, mientras que *Pediococcus* y *Lactobacillus* permanecen como principal flora causante de las posibles alteraciones.

Las células de *Pediococcus* pueden continuar viables en el vino durante su almacenamiento. Aunque no tienen un posterior crecimiento, las células continúan activas tras largos periodos de almacenamiento, produciendo compuestos no deseables que pueden afectar a la calidad del vino (Costantini 2009).

Alteraciones en el vino

Las principales alteraciones que las bacterias del género *Pediococcus* pueden ocasionar en el vino son las siguientes:

- Olor a mantequilla. *Pediococcus* produce diacetilo (2,3-butanodiona), que a elevadas concentraciones (>5-7 mg/l) puede dar lugar a olores y aromas lácteos no deseables. Sin embargo, este olor a mantequilla puede ser beneficioso bajo determinadas circunstancias. Por ejemplo, en los vinos Cabernet-Sauvignon el diacetilo producido por *P. parvulus* altera el bouquet sin ser defectuoso (< 4 mg/l).

- Amargor. La degradación bacteriana del glicerol a acroleina hace que esta reaccione con los grupos fenólicos de los antocianinos dando lugar a una contaminación amarga o amargor. Por esta razón los vinos tintos embotellados, con alto contenido fenólico son más propensos que los vinos blancos a sufrir esta alteración. Una concentración de 10 ppm es suficiente para amargar un vino. Los

vinos que han llevado a cabo la FML muestran 10 veces o más contenido en acroleina (2,8 mg/l) así como una menor concentración de glicerol. Sin embargo la capacidad de degradar el glicerol no parece ser una característica general entre las BAL ya que según un estudio realizado por Davis y cols. (1988) solo el 12% de las cepas de *P. parvulus*, transforman el glicerol en acroleina.

En vinos poco ácidos y secos algunas cepas de *Pediococcus* pueden formar polisacáridos extracelulares, descrito como ahilado del vino. Esta alteración normalmente se detecta por un aumento en la viscosidad dando lugar a vinos de aspecto oleoso

- Ahilado del vino. En vinos poco ácidos y secos algunas cepas de *Pediococcus* pueden formar polisacáridos extracelulares (β -glucanos) en la parte exterior de su pared celular a partir de la glucosa del medio. Descrito como ahilado del vino por los enólogos, esta alteración normalmente se detecta por un aumento en la viscosidad, dando lugar a caldos filantes de aspecto oleoso. Este problema ocurre tanto durante la FOH como después del embotellamiento. El ahilado puede iniciarse en el fondo de la bodega y dispersarse por todo el recipiente. Sorprendentemente, bajas concentraciones de glucosa (50-100 mg/l) pueden ser suficientes para permitir la formación de los polisacáridos. Esto explica en parte

porqué esta alteración puede observarse varios meses después del embotellamiento. Los vinos que no han sido agitados, con pH-s elevados y con una fuente de glucosa y nitrógeno tienen más riesgo de sufrir este problema.

- Formación de aminas biógenas. Mediante descarboxilación de algunos aminoácidos las BAL, y entre ellas *Pediococcus*, forman aminas biógenas (principalmente histamina, tiramina y putrescina). Elevadas concentraciones de aminas biógenas presentes en alimentos y bebidas pueden producir dolores de cabeza, alteraciones respiratorias, palpitaciones cardíacas, hiper o hipotensión y fenómenos de alergia. En el caso del vino, aunque no existe una regulación definida, las recomendaciones de la OIV indican no sobrepasar los 12 mg/l de histamina.

Según un estudio de Landete y cols. (2005) el 16% de las cepas de *P. parvulus* son productoras de histamina y pueden producir hasta 40-50 mg/l de esta amina en el vino. Los principales factores que van a determinar su concentración en los vinos son la concentración de los aminoácidos precursores, la presencia de bacterias con el enzima descarboxilante y el pH del vino. A su vez la cantidad del aminoácido va a estar influenciada por ciertas prácticas enológicas, tales como el uso de uvas muy maduras, el grado de maceración con los hollejos, el contacto prolongado del vino con las lías, que provocan un enriquecimiento del vino en proteínas y aminoácidos.

La concentración de aminas biógenas durante y después de la fermentación alcohólica es baja y aumenta después de la FML, por lo que su presencia está directamente ligada al metabolismo de *Pediococcus* y de las BAL en general. Aún más, tras la FML cuando el vino es sulfitado para eliminar las poblaciones indeseables de bacterias, la concentración de aminas puede seguir evolucionando y llegar hasta los 50 mg/l durante la crianza. Esto se debe a que las poblaciones residuales de BAL mantienen la actividad enzimática descarboxilasa activa como mecanismo de generación de energía para la supervivencia de la célula.

– Paradas de la FML. Las bacteriocinas, como la nisina o la pediocina, son pequeños polipéptidos producidos y secretados por BAL, entre ellas *Pediococcus*, y que inhiben el crecimiento de otras especies de bacterias. Por ejemplo, las bacteriocinas de algunas *Pediococcus* inhiben el crecimiento de *Oenococcus oeni* y viceversa, con lo que se pueden dar problemas en el correcto desarrollo de la FML, conduciendo en algunos casos a la parada de la misma.

– Olor a geranio. Por último, *Pediococcus* también puede metabolizar el ácido sórbico utilizado como preservativo químico, dando lugar a la formación del 2-etoxyhexa-3,5-dieno, el cual da un olor que recuerda a hojas de geranio. Por ello, se debe tener especial atención al embotellar vinos tratados con ácido sórbico y asegurarse de que la población bacteriana ha sido eliminada anteriormente.

Detección e identificación

El control de la población microbiana durante y después de la fermentación es de enorme importancia para la calidad del vino. A menudo las contaminaciones microbiológicas son indetectables hasta que los problemas relacionados se hacen perceptibles mediante evaluación sensorial, por lo que una temprana detección e identificación, así como un seguimiento adecuado durante todo el proceso, son imprescindibles para el correcto desarrollo del producto final.

Al igual que la mayoría de las bacterias, el aislamiento de *Pediococcus* se puede llevar a cabo fácilmente mediante técnicas de microbiología tradicional. La población de *Pediococcus* presente en un mosto o vino se puede analizar me-

dante la siembra en el medio agar MRS (Man Rogosa y Sharpe), tras su incubación en condiciones de anaerobiosis durante 10-15 días a 30 °C (ver figura 2). Sin embargo, debido a que muchas bacterias tienen necesidades nutricionales muy similares y pueden crecer bajo las mismas condiciones, estos métodos pueden dar resultados ambiguos y deben ser complementados con otras técnicas de identificación.

El análisis de las características morfológicas de las células mediante microscopía, la tinción Gram, y los test de actividad catalasa o la fermentación de glucosa, entre otros, pueden ayudar en las fases iniciales de la identificación a nivel de género. Actualmente, también existen kits bioquímicos que permiten la identificación mediante perfiles de fermentación de diferentes carbohidratos. Sin embargo, estos análisis dependen del estado metabólico de la célula y a menudo presentan una variabilidad significativa entre diferentes cepas dentro de las mismas especies de *Pediococcus*, por lo que los resultados obtenidos deben analizarse con cuidado.

Hoy en día, gracias a los avances realizados en el campo de la biología molecular, es posible detectar e identificar a nivel de cepa los diferentes microorganismos presentes en el vino de forma rápida y fiable, lo cual es especialmente útil en el seguimiento de procesos fer-

El aislamiento de *Pediococcus* se puede llevar a cabo fácilmente mediante técnicas de microbiología tradicional. La población de esta bacteria en un mosto o vino se puede analizar mediante la siembra en el medio agar MRS, tras su incubación

mentativos y en el control de microorganismos alterantes como *Pediococcus*.

Entre los métodos moleculares cabe destacar el análisis de restricción del gen del DNA ribosómico 16S amplificado mediante PCR (16S-ARDRA). Rodas y cols. (2003) adaptaron la técnica para la identificación rápida y sencilla de diferentes especies de BAL aisladas a partir de vino y mosto. Por otro lado, la amplificación por PCR del gen *rpoB* y la posterior separación de los fragmentos obtenidos mediante la electroforesis en

gradiente desnaturizante (PCR-DGGE) permite la identificación simultánea de diferentes BAL durante el proceso de vinificación y sin la necesidad de un cultivo preliminar (Renouf 2006).

También se han desarrollado diferentes sistemas moleculares de detección interesantes, en los que se correlaciona la presencia de un determinado gen y la correspondiente actividad enzimática que produce la alteración en el vino. De este modo, mediante sondas para hibridación o PCR específicas para ese gen se puede determinar qué BAL presentes en un mosto o vino son peligrosas y en qué

EN SÍNTESIS...

1. *Pediococcus* es un género de bacterias lácticas que bajo determinadas condiciones puede alterar las propiedades organolépticas del vino
2. pH-s elevados (>3,5), bajo contenido en sulfuroso, presencia de azúcares fermentables y temperaturas elevadas favorecen el crecimiento de *Pediococcus*
3. *Pediococcus* puede provocar alteraciones como el ahijado del vino, amargor, concentraciones elevadas de aminas biógenas u olores desagradables, entre otras
4. Un estricto control higiénico de las instalaciones y evitar las condiciones que favorecen el crecimiento de esta bacteria son imprescindibles para asegurar la calidad del producto final
5. Una temprana detección de *Pediococcus* en el vino permite tomar las medidas necesarias antes de que la alteración sea irreversible y las pérdidas económicas mayores

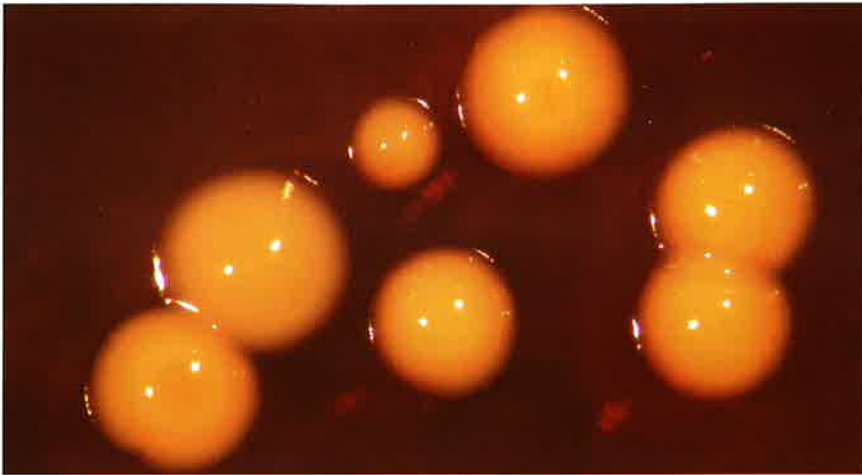


Figura 2. Colonias de *Pediococcus*

cantidad se encuentran. Así por ejemplo, se ha desarrollado un método basado en el gen *hdc* responsable de la actividad histidina descarboxilasa que permite detectar cepas productoras de histamina (Landete 2005). Con el mismo enfoque, Werning y cols. (2006) desarrollaron un método de PCR basado en la detección del gen *gtf* que codifica la glicosiltransferasa responsable de la síntesis de los polisacáridos en las BAL que provocan el ahilado de los vinos y otras bebidas alcohólicas. De este modo, se puede detectar la contaminación por *Pediococcus* en un estado temprano y tomar las medidas necesarias antes de que la alteración sea irreversible y las pérdidas económicas mayores.

Prevención y tratamiento

Al igual que en el resto de contaminaciones de vino por microorganismos, en el caso de *Pediococcus* también se deben adoptar una serie de procedimientos preventivos básicos.

En primer lugar, se recomienda extremar las condiciones de higiene en bodega, tanto en el ambiente como en los materiales y superficies de la misma.

Asimismo, es muy importante controlar el proceso de vinificación y evitar aquellas condiciones que favorezcan el crecimiento de la bacteria alterante. Tal y como ya se ha mencionado, el pH es uno de los factores más importantes que influye en el crecimiento de *Pediococcus*. Vinos con un pH elevado (> 3,5) favorecen el crecimiento de las BAL en general y son más propensos a sufrir alteraciones. Relacionado con esto, cabe

recordar que el SO_2 es un potente inhibidor del crecimiento de bacterias en vino, pero su forma activa (antimicrobiana) es dependiente del pH. Valores de pH cercanos a 4,0 hacen que el tratamiento con sulfuroso, aun a dosis muy altas, sea poco o nada eficaz. Otro de los factores que favorece el crecimiento de *Pediococcus* y por tanto el desarrollo de alteraciones, es la temperatura elevada durante la FML. Se aconseja mantener la temperatura entre 20 y 21 °C. Por ejemplo, una temperatura baja durante la FML limita la producción de diacetilo, permitiendo una mayor expresión varietal del vino (Navascués 2005).

En los últimos años el uso de lisozimas para controlar las BAL no deseadas se presenta como una alternativa natural al uso de elevados niveles de SO_2 . La lisozima puede añadirse en diferentes fases durante la vinificación y es más activa que el sulfuroso a pH-s elevados. El aroma del vino no se ve afectado pero al igual que con otros tratamientos, se debe tener mucho cuidado ya que puede unirse a taninos y polifenoles en los vinos tintos y provocar una ligera reducción en el color.

Por otro lado, un estudio reciente de Rojo Bezares (2007) muestra cómo la bacteriocina nisina tiene un efecto sinérgico junto con el SO_2 , multiplicando hasta ocho veces el efecto de este último frente a *Pediococcus*, lo cual permitiría reducir la concentración de SO_2 para preservar el vino durante los procesos de elaboración, envejecimiento y almacenamiento. A pesar de que las bacteriocinas procedentes de las BAL no supo-

nen ningún riesgo para la salud humana, cuentan con el estatus QPS (Presunción Cualificada de Seguridad) y tienen importantes aplicaciones como preservativos naturales en alimentación; hoy en día todavía no está permitido su uso en enología.

En bodegas con problemas durante la FML también es recomendable inocular los mostos o vinos con cultivos de BAL iniciadores seleccionados. De esta manera, por un lado nos aseguramos, a priori, que la bacteria introducida es segura, con propiedades óptimas y que no van a producir compuestos indeseables. Por otro lado, la competencia microbiana, puede reducir sensiblemente el crecimiento de la población bacteriana autóctona y el peligro que estas pueden suponer.

Una vez producida la alteración por *Pediococcus*, y a modo de acción curativa, se puede recurrir a métodos físicos tradicionales como la precipitación, decantación, centrifugación o filtración con el fin de reducir la población bacteriana.

En el caso del ahilado del vino, aunque aparentemente la viscosidad es una alteración muy escandalosa, no suele ser de gravedad. Basta con agitar violentamente el vino para destruir la unión entre bacterias, para posteriormente eliminarlas por filtración y dejar protegido el vino con al menos 35 mg/l de anhídrido sulfuroso libre (Hidalgo 2002).

Unas buenas prácticas de higiene en la bodega y el control sobre los diferentes parámetros que favorecen el crecimiento de *Pediococcus*, así como el control de la población microbiana durante el proceso, permitirán evitar las posibles alteraciones ocasionadas por esta bacteria y por lo tanto, obtener un producto final de calidad.

>> Referencia bibliográfica de autores

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