

Artículo original

Aislamiento e identificación de bacterias lácticas a partir de mosto de uvas

Isolation and identification of lactic acid bacteria from grape must

Eugenia Pose^a, Gabriel Alejandro Rivas^{a,b}, Lucrecia Delfederico^a, Nair Temis Olguin,^{a,b,c}

a. Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña N° 352, (B1876BXD) Bernal, Buenos Aires, Argentina.

b. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, (C1425FQB) CABA, Argentina.

c. Laboratorio de Microbiología Enológica, Instituto de Tecnología e Innovación, Universidad de Morón

Manuscrito recibido: 17 de marzo de 2023; aceptado para publicación: 31 de julio de 2023

Autor de Contacto: Dra. Nair Temis Olguin. Laboratorio de Microbiología Enológica, Instituto de Tecnología e Innovación, Universidad de Morón, Machado N° 914, (B1708BPH) Morón, Buenos Aires, Argentina. E-mail: ntolguin@gmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue el de aislar e identificar bacterias ácido-lácticas (BAL) a partir de uvas de tres variedades (Malbec, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon), provenientes de un viñedo localizado en Mendoza, Argentina. Se aislaron colonias bacterianas del mosto de Cabernet Sauvignon obtenido luego de estrujar las uvas y posterior cultivo en medio MRS suplementado a pH 5.0. La tipificación se efectuó por la técnica RAPD-PCR con el primer M13 y se observó un patrón similar indicando que las colonias pertenecían a la misma especie. Por lo tanto, una de estas muestras se envió para secuenciación y se identificó mediante el análisis de secuencia del gen 16S rDNA como *Lactiplantibacillus plantarum*. No se logró aislamiento de BAL del mosto de uvas de las variedades Malbec y Cabernet Franc siguiendo los mismos procedimientos.

Palabras clave: bacterias lácticas, aislamiento de cepas, mosto de uvas, *Lactiplantibacillus plantarum*

Abstract

The aim of this work was to isolate and identify lactic acid bacteria from grapes of three vine varieties (Malbec, Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon) from a vineyard located in Mendoza, Argentina. We were able to isolate lactic acid bacteria colonies from Cabernet Sauvignon from the grapes after crushing and cultivation in MRS supplemented medium at pH 5.0. The bacterial colonies were typed using RAPD-PCR with M13 primer and a similar pattern was observed indicating it that colonies belonged to the same species. Therefore, one of these samples was submitted for sequencing and identified by the sequence analysis of the 16S rDNA gen as *Lactiplantibacillus plantarum*. We were not able to isolate lactic acid bacteria from Malbec and Cabernet Franc from crushed grapes nor during alcoholic fermentation.

Keywords: lactic acid bacteria, strains isolation, grape must, *Lactiplantibacillus plantarum*

DOI: <http://doi.org/10.34073/319>

1. Introducción

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) han sido ampliamente estudiadas por su habilidad para conducir la fermentación maloláctica (FML) en el vino. Esta segunda fermentación es en realidad una decarboxilación, donde el ácido L-málico (dicarboxílico) es transformado en ácido L-láctico (monocarboxílico). La FML es deseada por diversas razones, de las que se destacan tres: i) disminuye la acidez, especialmente en vinos tintos de zonas frías o blancos de elevada acidez; ii) mejora la calidad organoléptica general debido a la aparición de compuestos beneficiosos derivados de las distintas rutas metabólicas y iii) incrementa la estabilidad microbiológica del vino debido al consumo de sustratos potenciales para microorganismos no deseados (Bartowsky 2017).

Si bien diferentes especies de BAL pueden intervenir en la FML, el mayor interés recae en dos especies: i) *Oenococcus oeni* por ser la bacteria más tolerante a las exigentes condiciones del vino (bajo pH, elevadas concentraciones de etanol y anhídrido sulfuroso) y, ii) *Lactiplantibacillus plantarum* (antes *Lactobacillus plantarum*) ya que se ha demostrado que pueden sobrevivir y crecer en las condiciones del vino y aportar al mismo características organolépticas favorables (Pozo-Bayón et al., 2005; Lerm et al., 2011; du Toit et al., 2011; Lucio et al., 2017). Por ello es que actualmente se evalúan estas dos especies como posibles cultivos iniciadores de la FML. La importancia del empleo de iniciadores malolácticos (o *starters*) radica en que si bien las cepas autóctonas de *O. oeni* y/o *Lpb. plantarum*, presentes en mosto/vino, pueden proliferar espontáneamente y conducir la FML, cualquier retraso en el inicio de la misma o su detención, podrían provocar una alteración de la calidad del vino. No obstante, y aun empleando cultivos iniciadores, la dificultad de inducir exitosamente la FML puede resultar problemática si las cepas inoculadas no logran implantarse (Reguant et al. 2005). Para una implantación exitosa se requiere optimizar los cultivos iniciadores, adquiriendo un mayor conocimiento sobre las complejas interacciones existentes entre las bacterias y el medio donde se desarrollan.

En el Laboratorio de Microbiología Molecular, de la Universidad Nacional de Quilmes (LMM – UNQ), se han aislado y caracterizado numerosas cepas de *O. oeni* y *Lpb. plantarum* autóctonas de vinos tintos patagónicos y se han conducido diversos estudios que permitieron pre-seleccionar cepas con

potencial para su empleo como cultivos iniciadores (Valdés La Hens et al., 2015; Bravo-Ferrada et al., 2013, 2016; Bri-zuela et al., 2017; 2018a, b; Manera et al., 2019, Olguin et al., 2019). La posibilidad de contar con cultivos iniciadores o *starters* tiene como objetivo lograr vinos de calidad controlada, corrigiendo la variabilidad entre vendimias en fermentaciones espontáneas o naturales, y disminuyendo el riesgo de sucesos negativos asociados a éstas, que representan un serio problema para el sector productivo por las pérdidas económicas que ocasionan (detenciones prematuras de fermentaciones, fermentaciones retrasadas, contaminación microbiana de mostos, etc.) (Reguant et al., 2005). No obstante, en la provincia de Mendoza, algunas bodegas llevan a cabo la FML espontánea corriendo el riesgo de un aumento en la acidez volátil, paradas y/o contaminaciones o inoculan con cepas comerciales que provienen de otros países y han sido seleccionadas a partir de vinos internacionales. En el último caso, se plantea el problema de la disminución de las características propias del terruño, junto a la posible pérdida de las ventajas que podrían tener organolépticamente los vinos fermentados con cepas nativas.

En base a esta problemática, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar cepas de BAL presentes en uvas de la provincia de Mendoza, así como poner a punto la técnica de aislamiento a partir de uvas ya que mayormente los aislamientos se realizan a partir de mosto en fermentación o al final de la fermentación alcohólica (FA).

2. Material y Métodos

2.1. Muestras de uvas

Se recogieron uvas de la especie *Vitis vinifera* L, en tubos estériles tipo Falcon de 50 ml utilizando guantes, tijera y pinzas lavadas en alcohol al 70%. Los varietales seleccionados fueron Malbec, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon de un viñedo ubicado a unos 1200-1300 msnm en Gualtallary, Tupungato, Valle de Uco, Mendoza. Las uvas fueron transportadas con refrigeración hasta su procesamiento.

2.2. Procesado de las uvas

Las uvas fueron aplastadas en el mismo tubo en el cual se transportaron y se tomaron dos muestras de 100 μ l de mosto, una de las cuales se inoculó en 10 ml de medio estéril MRS suplementado (De Man et al., 1960) a pH 5.0 con 5.0

g/L de DL-ácido málico y 4.0 g/L de fructosa. La segunda muestra se inoculó en MRS suplementado y con adición de 0.5 g/L de cisteína, 25 mg/L de azida sódica, 100 mg/L de cicloheximida y 20 mg/L de nistatina con el objetivo de inhibir el crecimiento de levaduras y estimular el desarrollo de BAL. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante una semana en condiciones microaerófilas. El resto del mosto fue colocado a 21 °C y se dejó continuar con la FA espontánea.

2.3. Toma de muestras durante la fermentación alcohólica

Se tomaron muestras de 100 μ l de mosto en fermentación a los 7 y 14 días, las que se procesaron de la misma forma que el mosto inicial. Adicionalmente, se sembraron placas con medio MRS suplementado sólido (20 g/L de agar). También se tomaron muestras de 10 μ l cada una, para observación al microscopio mediante tinción de Gram.

2.4. Aislamiento de BAL

A partir de los tubos con MRS en los cuales se detectó un mayor desarrollo microbiano, se tomaron muestras de 100 μ l y se repicaron en placas de Petri con MRS suplementado. Las mismas se colocaron en estufas a 28 °C durante al menos una semana. A partir de las colonias crecidas, se seleccionaron dos de ellas mediante microscopía óptica ya que cumplían características compatibles con BAL y se repicaron en tubos conteniendo MRS líquido suplementado a 28 °C.

2.5. Extracción de ADN genómico

Se extrajeron muestras de los medios líquidos con desarrollo para la extracción de ADN genómico. Se trabajó, siguiendo las indicaciones del proveedor, con el kit para bacterias Gram positivas (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Quick - GENE AID), según las indicaciones del proveedor.

2.6. Tipificación de cepas de BAL por RAPD-PCR

La tipificación de las 2 cepas en estudio se efectuó mediante RAPD-PCR. La mezcla de reacción consistió en 1.5 μ L de buffer 10X (Invitrogen Corp.), 0.2 mM de cada dNTP, 10 μ M del primer (cebador) M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), 2.5 nM de MgCl₂, 100 ng de DNA cromosomal y 1.5 U de Taq DNA polimerasa, en un volumen total de 20 μ L. Las reacciones de amplificación se realizaron en un ciclador Eppendorf modelo Mastercycler Gradient, bajo las siguientes

condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, *annealing* a 30 °C por 30 s y extensión de 72 °C por 1.5 min. La extensión final se realizó a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.8 %, en presencia de gel red y de un *Ladder* (marcador de peso molecular) de 100 pb (Productos Bio-Lógicos UNQ).

2.7. Identificación de cepas mediante secuenciación

La identificación de cepa se realizó mediante la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1500 pb del gen 16S rRNA. Los *primers* empleados fueron: PA16SF (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') y PH16SR (5'-AAGGAGGTGATCCAGC-CGCA-3') (Rodas et al., 2003). La PCR se realizó en un volumen final de 30 μ l y los componentes de la misma fueron: 3 μ l de buffer 10X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl pH 8,4), 3 μ l dNTPS 2 mM, 1.2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 3 μ l de PA16SF y PH16SR, 0.3 μ l de taq ADN polimerasa (Invitrogen Corp.), agua y 1 μ l de ADN total. La amplificación se realizó en un ciclador Eppendorf modelo Mastercycle Gradient en las condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, *annealing* a 55 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 1 min; con una etapa de elongación final de 72 °C durante 5 min. El amplicón se envió a secuenciar (Macrogen, Korea). Una vez obtenida la secuencia, la identificación se realizó utilizando BLAST, por comparación contra base de datos de 16S rRNA de GenBank.

2.8. Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento se realizó en 10 ml de medio MRS suplementado, a partir de un cultivo con una densidad óptica (DO 600 nm), de 0.5. Se realizó un seguimiento durante intervalos hasta las 45 h. Todas las mediciones se realizaron por triplicado en cultivos independientes.

3. Resultados

3.1. Crecimiento de BAL a partir de las distintas variedades de uva

En el caso de las muestras provenientes de las variedades Malbec y Cabernet Franc no se obtuvo desarrollo de BAL. Si bien se observó por microscopía óptica la presencia de bacterias con características correspondientes con BAL en las

muestras tomadas durante la FA, la proporción respecto de los elementos levaduriformes era muy inferior. En los cultivos sembrados en placa de Petri con medio MRS suplementado solamente se desarrollaron colonias de levaduras.

No obstante, en el caso de la variedad Cabernet Sauvignon, hubo crecimiento inmediato de bacterias con características correspondientes a BAL en todas las muestras tomadas según la observación bajo microscopía óptica. Este crecimiento estuvo acompañado de una elevada proporción de levaduras en las muestras tomadas durante la FA. Sin embargo, en la muestra inicial, antes del comienzo de la FA, la cantidad de BAL detectada fue mayor a la proporción de levaduras. A partir de esta muestra se seleccionaron las 2 colonias que fueron identificadas, previo repique a MRS líquido, extracción de ADN, tipificación e identificación.

3.2. Tipificación e identificación de la cepa

Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante la técnica RAPD-PCR resultaron ser idénticos (**Fig. 1**), determinándose que los dos aislamientos analizados pertenecían a una misma cepa. Por ello, sólo una de ellas se envió a secuenciar. La secuencia obtenida a partir de dicha secuenciación (**Fig. 2**), resultó tener un porcentaje de identidad del 99.89 % con *Lactiplantibacillus plantarum*, con un *E-value* de 0.0.

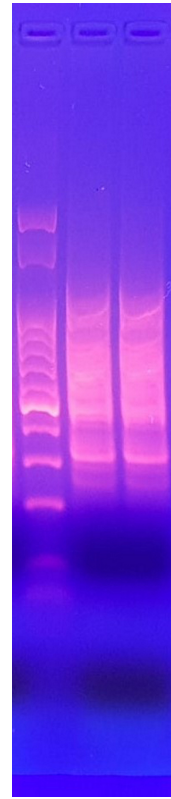


Figura 1. Perfiles electroforéticos de dos cepas de BAL aisladas a partir de mosto de la variedad Cabernet Sauvignon, obtenidos mediante la técnica RAPD-PCR utilizando el cebador M13.

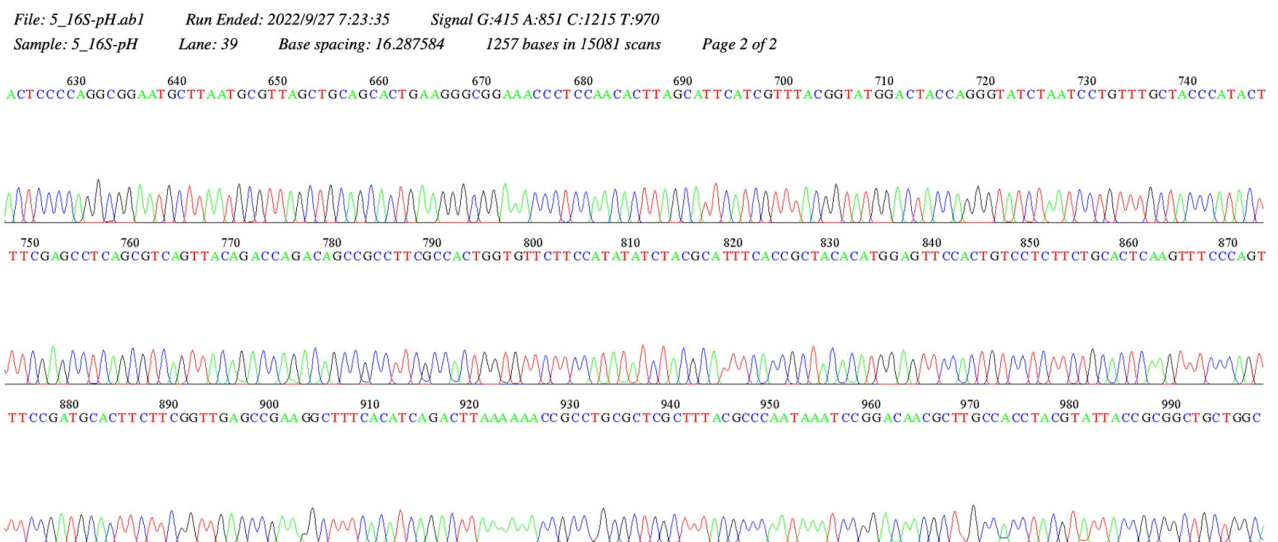


Figura 2. Fragmento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del amplicón correspondiente a un fragmento del gen 16S rRNA de la cepa de BAL aislada del mosto de la variedad Cabernet Sauvignon.

3.3. Cinética de crecimiento de la cepa aislada

La curva obtenida (**Fig. 3**), muestra que la cepa aislada alcanza la fase estacionaria a las 40 h en las condiciones ensayadas. El tiempo de generación estimado fue de aproximadamente 3.57 h, calculado utilizando la escala logarítmica de Microsoft Excel (Office Hogar y Estudiantes 2021).

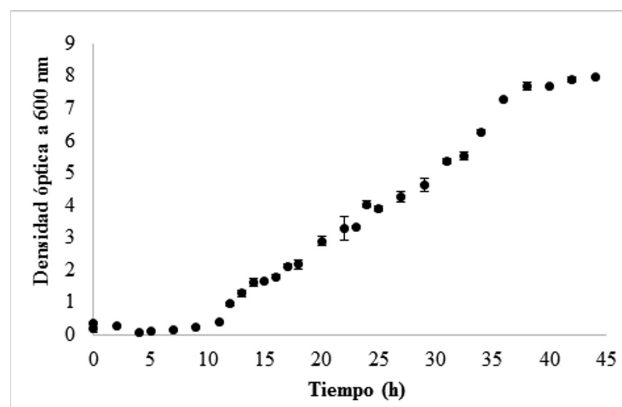


Figura 3. Cinética del crecimiento de *Lactiplantibacillus plantarum* aislado e identificado a partir de mosto de la variedad Cabernet Sauvignon, cultivado en MRS suplementado, pH 5.0 e incubado a 28 °C.

4. Discusión

En este trabajo se logró el aislamiento de BAL de uvas estrujadas de la variedad Cabernet Sauvignon. Según la bibliografía, no es siempre posible aislar BAL a partir de uvas recién cosechadas (Bae et al., 2006; Franquès et al., 2017; Renouf et al., 2005). En consonancia con lo reportado por estos autores, no se obtuvo aislamiento de los cultivos efectuados a partir de las variedades Malbec y Cabernet Franc. Aún no se conoce del todo el por qué. Las hipótesis que se plantean son: i) la pequeña cantidad de BAL presentes en la piel de las uvas que sólo logran desarrollarse durante o al final de la FA, ii) que muchas veces, las BAL aisladas del mosto en fermentación o al final de la FA son residentes en la bodega y pasan desde el material hacia el mosto. Sobre este último punto, se ha desarrollado un trabajo en el que se encontró que algunas BAL sobreviven en el material de la bodega formando biofilms (Bastard et al., 2016). En otros trabajos se ha logrado aislar *O. oeni* a partir del mosto pero luego de haber entrado en bodega (Cruz-Pio et al., 2017; Saguir et al., 2009). También se ha propuesto que el creci-

miento de algunas cepas interfiere en el crecimiento de otras (Bae, et al., 2006), como pudo haber sucedido en las muestras de Cabernet Sauvignon de las que aislamos las colonias de *Lpb. plantarum*. Por otro lado, la hipótesis sobre la necesidad de que se desarrolle la FA para activar el crecimiento de BAL, no es clara en base a los resultados de este trabajo, pero existe evidencia de que las lías (levaduras muertas), pueden liberar componentes que estimulan al crecimiento de las BAL (Balmaseda et al., 2021; Hernández-Macias et al., 2021). Se plantea la duda respecto a la variabilidad de recuperación de en las uvas recién cosechadas. De hecho, la especie más difícil de aislar a partir de uvas es *O. oeni*, (Franquès et al., 2017; Garijo et al., 2011; Renouf et al., 2007). Sólo Franquès et al. (2017) y Garijo et al. (2011), fueron capaces de aislar *O. oeni* a partir de mosto fresco, mientras que Renouf et al. (2007), solamente detectó *O. oeni* a partir de técnicas moleculares independientes de cultivo. *Lpb. plantarum*, dentro de las especies más importantes en la FML, es frecuente que, proporcionalmente sea la más aislada. Quedaría por investigar si hay diferencias en el metabolismo y/o resistencia a las condiciones del vino cuando se comparan las BAL aisladas a partir de uvas de aquellas aisladas a partir del mosto en fermentación o al final de la FA. Si bien hay diferentes técnicas para la identificación de BAL, hemos comprobado que la tipificación mediante la técnica RAPD-PCR utilizando el cebador M13, es una técnica viable y rápida para diferenciar cepas (Manera et al. 2019; Rossetti y Giraffa, 2005; Zapparoli et al., 2000). Del mismo modo, la técnica de Rodas et al. (2003), utilizando los cebadores PA16SF y PH16SR nos ha permitido obtener una secuencia lo suficientemente buena como para ser secuenciada y cuyo resultado nos permitió identificar a qué especie pertenece la cepa aislada. De hecho, la identificación de cepas a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA es actualmente la más utilizada, aunque los cebadores utilizados pueden variar, amplificando distintas regiones de este gen (Franquès et al., 2017; Garijo et al., 2011; Valdés La Hens et al., 2015). En este momento, estamos trabajando en el envío de la secuencia para su anotación en la base de datos del GenBank. En cuanto a la cinética de la cepa *Lpb. plantarum*, su comportamiento es similar al de sus pares aislados a partir de vino, evaluados en condiciones similares de cultivo (Filimon et al., 2022), con un crecimiento rápido llegando antes de

las 40 h a la fase estacionaria. Si bien muchos trabajos describen un crecimiento más rápido de *Lpb. plantarum*, llegando a la fase estacionaria en 24 h o menos, se ha observado que la velocidad de crecimiento menor puede deberse al pH del medio de cultivo utilizado, a las fuentes de carbono, a la temperatura de incubación y a la cantidad de oxígeno (Georgieva et al., 2009; Smetanková et al., 2012). *Lpb. plantarum* posee un pH óptimo de 6.0, es decir que el menor pH del medio de cultivo podría influir en la velocidad de crecimiento, velocidades que hemos observado previamente en nuestro laboratorio (resultados no publicados). Restaría por evaluar la viabilidad de la cepa aislada una vez inoculada en vino, así como también su capacidad para consumir ácido málico en distintos varietales, con el fin de determinar si es apta para su uso como cultivo iniciador. Poder aislar diferentes cepas de BAL que representen a un terruño en particular podría utilizarse para obtener cultivos iniciadores en cada región y bodega del país. Esto significa que no sólo podría tenerse un mejor control de la FML, sino que además, puedan seleccionarse cepas que beneficien a determinados vinos dependiendo de las características organolépticas que cada cepa de BAL.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con los subsidios de la Universidad Nacional de Quilmes (Programa Microbiología Básica y Aplicada a Agronomía, Alimentos y Salud – Resolución (R) N° 990/19); y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019 N° 0008 and PICT 2021 Apl. Int. N° 0013; PIBAA 2022 N° 28720210100183CO). EP es estudiante de la UNQ y agradece su beca EVC-CIN 2021, GR es estudiante de doctorado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); LD es profesora de la UNQ; NTO es miembro de la Carrera de Investigación del CONICET.

Referencias

- Bae, S., Fleet, G.H., Heard, G.M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4): 712-727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x>
- Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., Reguant, C. (2021). Simulated lees of different yeast species modify the performance of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* in wine-like medium. *Food Microbiology*, 99: 103839. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103839>
- Bartowsky, E. (2017). *Oenococcus oeni* and the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 41: S84-S94. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux034>
- Bravo-Ferrada, B.M., Hollmann, A., Delfederico, L., Valdés La Hens, D., Caballero, A., Semorile, L. (2013). Red Patagonian wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 1537-1549. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1337-x>
- Bravo-Ferrada, B.M., Hollmann, A., Brizuela, N., Valdés La Hens, D., Tymczyszyn, E.E., Semorile, L. (2016). Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Microbiologica*, 61(5): 365-73. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0446-y>
- Brizuela, N., Bravo-Ferrada, B.M., Valdés La Hens, D., Hollmann, A., Delfederico, L., Caballero, A., Tymczyszyn, E.E., Semorile, L. (2017). Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *FWT - Food Science and Technology*, 77: 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.023>
- Brizuela, N., Bravo-Ferrada, B.M., Pozo-Bayón, M.A., Semorile, L., Tymczyszyn, E.E. (2018a). Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni*. *Food Research International*, 106: 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.032>
- Brizuela, N., Bravo-Ferrada, B.M., Curilén, Y., Delfederico, L., Caballero, A., Semorile, L., Pozo-Bayón, M.A., Tymczyszyn, E.E. (2018b). Advantages of using blend cultures of native *L. plantarum* and *O. oeni* strains to induce malolactic fermentation of Patagonian Malbec wine. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02109>

- Cruz-Pio, L.E., Poveda, M., Alberto, M.R., Ferrer, S., & Pardo, I. (2017) Exploring the biodiversity of two groups of *Oenococcus oeni* isolated from grape musts and wines: Are they equally diverse? *Systematic and Applied Microbiology*, 40: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.003>
- De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 69964 MRS Agar (Lactobacillus Agar). *Appl Bact.*, 1960, vol. 23, pp. 130-135.
- Filimon, R.V., Bunea, C.I., Nechita, A., Bora, F.D., Dunca, S.I., Mocan, A., Filimon, M. (2022). New malolactic bacteria strains isolated from wine microbiota: characterization and technological properties. *Fermentation*, 8(1): 31. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010031>
- Franquès, J., Araque, I., Palahí, E., Portillo, M.C., Reguant, C., Bordon, A. (2017). Presence of *Oenococcus oeni* and other lactic acid bacteria in grapes and wines from Priorat (Catalonia, Spain). *LWT – Food Science and Technology*, 81: 326-334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.054>
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., & Gutiérrez, A.R. (2011). Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research and Technology*, 233: 359-365. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1528-3>
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., Danoca, S. (2009). Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(1): 861-865. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818558>
- Hernández-Macias, S., Comas-Basté, O., Jofré, A., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, A.L., Vidal-Carou, M.C. (2021). Growth-promoting effect of Cava lees on lactic acid bacteria strains: a potential revalorization strategy of a winery by-product. *Foods*, 10(7): 1636. <https://doi.org/10.3390/foods10071636>
- Lerm, E., Engelbrecht, L., du Toit, M. (2011). Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(2): 280-295.
- Lucio, O., Pardo, I., Heras, J.M., Krieger-Weber, S., Ferrer, S. (2017). Use of starter cultures of *Lactobacillus* to induce malolactic fermentation in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23: 15-21. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12261>
- Manera, C., Olguin, N.T., Bravo-Ferrada, B.M., Tymczyszyn, E.E., Delfederico, L., Bibiloni, H., Caballero, A.C., Semorile, L., Valdés La Hens, D. (2019). Survival and implantation of indigenous psychrotrophic *Oenococcus oeni* strains during malolactic fermentation in a Patagonian Pinot noir wine. *LWT – Food Science and Technology*, 108: 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.063>
- Olguin, N.T., Valdés La Hens, D., Delfederico, L., Semorile, L. (2019). Relative expression of stress related genes during acclimation at low temperature of psychrotrophic *Oenococcus oeni* strains from Patagonian wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35:5. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2577-6>
- Pozo-Bayón, M.A., G-Alegría, E., Polo, M.C., Tenorio, C., Martín-Álvarez, P.J., Calvo de la Banda, M.T., Ruiz-Larrea, F., Moreno-Arribas, M.V. (2005). Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8729-8735. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf050739y>
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., Bordon, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*, 246: 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.045>
- Renouf, V., Claisse, O., Lovaud-Funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 316-327. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 149-164. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 412-422. <https://doi.org/10.1078/072320203322497446>
- Rossetti, L., Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63(2): 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.001>
- Saguir, F.M., Campos, I.E.L., Maturano, C., & Manca de

Nadra, M.C. (2009). Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assesment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. *International Journal of Wine Research*, 1: 175-185. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4567>

• Smetanková, J., Hladíková, Z., Valach, F., Zimanová, M., Kohajdová, Z., Greif, G., Greifová, M. (2012). Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca*, 5(2): 204-210. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0031-1>

• du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., Krieger-Weber, S. (2011). Lactobacillus: the next generation of malolactic fermentation starter cultures – an overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 876-906. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0448-8>

• Valdés La Hens, D., Bravo Ferrada, B.M., Delfederico, L., Caballero, A.C., Semorile, L.C. (2015). Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1): 49-56. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12110>

• Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., Dellaglio, F. (2000). Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology*, 40: 351-355. <https://doi.org/10.1007/s002840010069>