

## RESOLUCIÓN OIV-OENO 632-2021

### TÉCNICAS ANALÍTICAS Y DE CONTROL MICROBIOLÓGICO ANÁLISIS COMUNES A TODAS LAS MONOGRAFÍAS

*ATENCIÓN: Esta resolución modifica las siguientes resoluciones:*

- OENO 17/2003
- OIV-OENO 328-2009
- OIV-OENO 329-2009

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 b) iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001, por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A PROPUESTA del Grupo de expertos “Microbiología”,

CONSIDERANDO la necesidad de actualizar las técnicas analíticas y de control microbiológico,

DECIDE reorganizar y modificar los apartados 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de la ficha F-COEI-2-CONBAC del Codex Enológico Internacional como sigue (en este proyecto de resolución solo se recogen las siete primeras páginas de la ficha F-COEI-2-CONBAC, dado que las modificaciones no afectan al resto de páginas):

#### **1. Rehidratación previa de las levaduras (*Saccharomyces* y no *Saccharomyces*): LSA (levaduras secas activas), AFY (levaduras congeladas activas), COY (levaduras comprimidas), CRY (crema de levaduras), ENY (levaduras encapsuladas y levaduras inmovilizadas), levaduras del licor de tiraje**

En condiciones de esterilidad, pesar unos 10mg del preparado (anotar el peso exacto para calcular la concentración).

En condiciones de esterilidad, llevar a 100mL con agua peptonada estéril\* a 20-37°C o según las indicaciones del fabricante.

Homogeneizar con cuidado durante 5min con una varilla, una técnica de stomacher o un agitador magnético.

Detener la agitación y dejar reposar durante 20min a temperatura ambiente

(20-30°C).

Homogeneizar de nuevo a temperatura ambiente durante 5 min.

En condiciones de esterilidad, preparar diluciones decimales seriadas con agua o agua peptonada estéril\* y realizar los controles microbiológicos con la solución madre homogeneizada.

En el caso de las levaduras de tiraje de los vinos espumosos, tomar 1 mL en condiciones de esterilidad, preparar diluciones decimales seriadas con agua o agua peptonada estéril\* y realizar los controles microbiológicos con la solución madre homogeneizada.

\* Solución salina de peptona: peptona bacteriológica 1 g/L, cloruro de sodio 8,5 g/L, pH final 7,0.

## 2. Rehidratación previa de los preparados de bacterias lácticas

En condiciones de esterilidad, pesar unos 10 mg del preparado de bacterias lácticas (anotar el peso exacto para calcular la concentración).

En condiciones de esterilidad (25°C), enrasar a 100 mL con agua peptonada estéril\*.

Homogeneizar con un agitador magnético o una técnica de stomacher durante 5 min.

Detener la agitación y dejar reposar durante 20 min a temperatura ambiente (20-30°C).

Homogeneizar durante 5 min a temperatura ambiente.

En condiciones de esterilidad, preparar diluciones decimales seriadas con agua o agua peptonada estéril\* y realizar los controles microbiológicos.

\* Solución salina de peptona: peptona bacteriológica 1 g/L, cloruro de sodio 8,5 g/L, pH final 7,0.

## 3. Control microbiológico de otros productos del Codex Enológico Internacional

(productos para los que se solicita el control de levaduras, bacterias y/o mohos)

Pesar unos 10 mg del producto enológico en condiciones de esterilidad (anotar el peso exacto para calcular la concentración).

En condiciones de esterilidad, enrasar a 100 mL con agua peptonada estéril\*.

Homogeneizar con un agitador magnético o una técnica de stomacher durante 5 min.

En condiciones de esterilidad, preparar diluciones decimales seriadas con agua o agua peptonada estéril\* y realizar los controles microbiológicos.

\* Solución salina de peptona: peptona bacteriológica 10g/L, cloruro de sodio 8,5g/L, pH final 7,0.

## 4. Recuento de levaduras totales

### Medio YM agar (MALT WICKERHAM)

Agar bacteriológico	15 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

### YPD

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agar	10 g
Agua	c.s.p 1000 mL

Inmediatamente después de su preparación, esterilizar el medio en autoclave a 120 °C durante 20min.

Si el período de incubación es largo, añadir cloranfenicol a una concentración final de 100mg/L para evitar la proliferación de bacterias.

Después de la inoculación con las diluciones de la muestra que correspondan para obtener 30-300 colonias, las placas se incuban a 25-30°C en aerobiosis durante

48-72 horas.

Contar el número de UFC de las placas con entre 30 y 300 colonias y expresar en función de la masa de extracto seco.

Además de los medios propuestos, se puede utilizar cualquier otro medio equivalente reconocido internacionalmente para el cultivo de estos microorganismos.

## 5. Recuento de levaduras no *Saccharomyces*

### 5.1. Medio de lisina

Las levaduras se cultivan en un medio de lisina cuya composición es la siguiente:

Agar	20 g
Monohidrocloruro de L-lisina	5 g
Glucosa	1 g
Púrpura de bromoscresol	0.015 g
Agua	q.s. 1000 mL
Ajusta	pH 6.8 ± 0.2

Llevar a ebullición y mantener durante 10 min para garantizar la disolución completa. A continuación, esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min.

Si el período de incubación es largo, añadir cloranfenicol a una concentración final de 100 mg/L para evitar la proliferación de bacterias.

Después de la inoculación con las diluciones de la muestra, las placas se incuban a 25°C o 30°C durante 48-96 horas.

Contar el número de UFC (placas con entre 30 y 300 colonias) y expresar en función de la masa de extracto seco.

Además de los medios propuestos, se puede utilizar cualquier otro medio equivalente reconocido internacionalmente para el cultivo de estos microorganismos.

## 5.2. Medio YPD enriquecido con cicloheximida (10 mg/L) e incubación durante 6-7 días en aerobiosis

Si el período de incubación es largo, añadir cloranfenicol a una concentración final de 100 mg/L para evitar la proliferación de bacterias.

## 6. Recuento de bacterias lácticas viables

MRS (Man, Rogosa y Sharpe) modificado

Las bacterias se cultivan en un medio MRS líquido (Man, Rogosa, Sharpe 1960) enriquecido con zumo de tomate cuya composición es la siguiente:

Agar agar	15 g
Bacto-peptona	10 g
Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	4 g
Acetato de sodio	5 g
$K_2HPO_4$	2 g
Citrato de trisodio	2 g
MgSO <sub>4</sub> a 100mg/L	2.5 mL
MnSO <sub>4</sub> a 20mg/L	2 mL
Tween 80	1 mL
Acido DL málico	5g
Zumo de tomate*	200 mL
Glucosa 20 g, o glucosa 10 g+fructosa 10 g	
HCl o NaOH	c.s.p. pH 4,8

Agua destilada

c.s.p 1000 mL

c.s.p. (cantidad suficiente para)

\* El zumo de tomate se utiliza para mejorar el crecimiento de las bacterias lácticas. Preparación: zumo de tomate industrial (sin aditivos) o casero; centrifugar 20min a 4000g; filtrar en caso necesario y utilizar el líquido transparente.

Esterilizar en autoclave durante 20min a 110 °C.

En el momento de verter el medio en la placa de Petri, añadir pimaricina a una concentración final de 10mg/L para inhibir la proliferación de levaduras y mohos.

Incubar a 25 °C durante 8-10 días en anaerobiosis.

Además de los medios propuestos, se puede utilizar cualquier otro medio equivalente reconocido internacionalmente para el cultivo de estos microorganismos.

## 7. Recuento de mohos

### Medio Czapek-Dox agar

Agar		15 g
Sacarosa		30 g
NaNO <sub>3</sub>		3 g
	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	1 g
MgSO <sub>4</sub>		0.5 g
KCl		0.5 g
	<i>FeSO<sub>4</sub></i>	0.01 g
Agua		c.s.p. 1000 mL
Ajustar		pH 7

Esterilizar en autoclave durante 20min a 120 °C.

Para inhibir la proliferación de bacterias, añadir cloranfenicol a una concentración final de 100µmg/L directamente en la placa de Petri que contiene el medio.

Incubar en aerobiosis a 20 °C durante 10 días.

Además de los medios propuestos, se puede utilizar cualquier otro medio equivalente reconocido internacionalmente para el cultivo de estos microorganismos.

## 8. Recuento de bacterias acéticas

Agar bacteriológico	20 g
Extracto de levadura	5 g
Hidrolizado de caseína	5 g
Glucosa	10 g
Ajustar a	pH 4.5
Agua	c.s.p 1000 mL

Esterilizar en autoclave durante 20min a 120 °C.

En el momento de verter el medio en la placa de Petri, añadir pimaricina a una concentración final de 100µmg/L para inhibir la proliferación de levaduras y mohos, y penicilina a una concentración final de 12,5µmg/L para inhibir la proliferación de bacterias lácticas.

Incubar en aerobiosis a 25 °C durante 4 días.

Además de los medios propuestos, se puede utilizar cualquier otro medio equivalente reconocido internacionalmente para el cultivo de estos microorganismos.