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 10□g del preparado (anotar el peso exacto para calcular la concentración).

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

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

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

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

(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□g 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□g 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.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

* Solución salina de peptona: peptona bacteriológica 1□g/L, cloruro de sodio 8,5□g/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 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 que correspondan para obtener 30-300 colonias, las placas se incuban a 25-30□°C en aerobiosis durante

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

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 1 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.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

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_4 a 100mg/L	2.5 mL
MnSO_4 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

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

Agua destilada	c.s.p 1000 mL

c.s.p. (cantitadad 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 20□min a 4000g; filtrar en caso necesario y utilizar el líquido transparente.

Esterilizar en autoclave durante 20□min a 110 °C.

En el momento de verter el medio en la placa de Petri, añadir pimaricina a una concentración final de 10□mg/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_3	3 g
K_2HPO_4	1 g
MgSO_4	0.5 g
KCl	0.5 g
$FeSO_4$	0.01 g
Agua	c.s.p. 1000 mL
Ajustar	pH 7

Esterilizar en autoclave durante 20□min a 120 °C.

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021

Para inhibir la proliferación de bacterias, añadir cloranfenicol a una concentración final de 100 mg/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
Adjustar a	pH 4.5
Agua	c.s.p 1000 mL

Esterilizar en autoclave durante 20 min a 120 °C.

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

Certificado conforme París, reunión híbrida, 12 de julio de 2021
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2021