Interreg Italia-Slovenija AGROTUR+

Cofinanziato dall'Unione europea
Sofinancira Evropska unija

D.2.1.2
Linee guida per il controllo microbiologico avanzato dei vini del Carso

Lorena Butinar, Branka Mozetič Vodopivec

Vipava, Dicembre 2025

D.2.1.2
Smernice za napredno mikrobiološko kontrolo kraških vin

Lorena Butinar, Branka Mozetič Vodopivec

Vipava, december 2025

Partner di progetto/Projektni partnerji:

Kmetijski inštitut Slovenije
Agricultural Institute of Slovenia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

CERCOT

ORA

Il progetto AGROTUR+ è co-finanziato dall'Unione europea nell'ambito del Programma Interreg VI-A Italia-Slovenia.
Projekt AGROTUR sofinancira Evropska unija v okviru Programa Interreg VI-A Italija-Slovenija.

www.ita-slo.eu/agrotur

Kazalo

1. Uvod 3
1.1 Namen, cilji in umestitev v verigo D.2.1.1–D.2.1.3 3
1.2 Metodologija in viri 3
1.3 Diseminacija: praktična delavnica in digitalna platforma 4
2. Okvir mikrobiološkega monitoringa: dva nivoja nadzora 4
2.1 Minimalni monitoring 4
2.2 Napredna mikrobiološka kontrola 5
3. Analitske metode napredne mikrobiološke kontrole 5
3.1 Klasične kultivacijske metode 5
3.2 Pretočna citometrija (FCM) 6
3.3 Kvantitativni PCR (qPCR) 6
3.4 Mikrobiomska analiza (sekvenciranje gena 16S rRNA) 6
3.5 Primerjava metod po kontrolnih točkah 7
4. Kontrolne točke in odločitvene matrike (»če … potem …«) 8
4.1 KT1 – Sprejem grozdja in mošta 8
4.2 KT2 – Alkoholna fermentacija 8
4.3 KT3 – Malolaktična fermentacija (MLF) 9
4.4 KT4 – Zorenje in skladiščenje pred stekleničenjem 9
4.5 KT5 – Predkontrola pred uradno oceno in stekleničenjem 10
5. Sintezna preglednica pragov tveganja 10
6. Priporočena pogostost vzorčenja in časovnica napredne kontrole 11
7. Prehod v D.2.1.3 – prenos smernic na platformo winecider.net 12
8. Zaključek 12

1. Uvod

1.1 Namen, cilji in umestitev v verigo D.2.1.1–D.2.1.3

Poročilo D.2.1.1 **Poročilo o dobrih praksah mikrobiologije vina teran** je združilo mednarodne standarde (OIV, AWRI), znanstveno literaturo ter rezultate mikrobiološkega spremljanja, izvedenega v okviru projekta AGROTUR+, v sintezno preglednico *dobra praksa – tveganje – ukrep nadzora – referenčni standard oziroma pravna podlaga* (D.2.1.1, poglavje 10) ter opredelilo štiri ključne skupine mikrobioloških tveganj pri pridelavi vina PTP Teran (D.2.1.1, poglavje 11.1).

Pričujoči dokument (D.2.1.2) te ugotovitve nadgrajuje v operativne smernice za mikrobiološko kontrolo. Za vsako ključno kontrolno točko pridelovalnega procesa (sprejem grozdja, alkoholna fermentacija, malolaktična fermentacija, zorenje vina in preverjanje ustreznosti pred stekleničenjem) opredeljuje parametre spremljanja, priporočene metode (osnovni ali napredni nivo kontrole) ter priporočene ukrepe ob ugotovljenih odstopanjih oziroma preseganju opozorilnih pragov. Smernice so predstavljene v obliki odločitvenih matrik tipa »če … potem …«).[1]

D.2.1.2 predstavlja drugi člen v verigi treh medsebojno povezanih dosežkov delovnega sklopa WP2. Dokument D.2.1.1 podaja pregled obstoječega znanja in dobrih praks, D.2.1.2 te ugotovitve pretvarja v operativne odločitvene matrike za napredno mikrobiološko kontrolo, D.2.1.3 pa jih nadgrajuje v uporabniku prilagojena navodila za platformo *winecider.net*.[2]

1.2 Metodologija in viri

Smernice temeljijo na: (1) sintezni preglednici in zaključkih poročila D.2.1.1; (2) mednarodnih standardih OIV (*Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts*) ter tehničnih priporočilih AWRI za napredne mikrobiološke in analitske metode; ter (3) rezultatih napredne mikrobiološke kontrole, izvedene v okviru projekta AGROTUR+ na vzorcih vina PTP Teran, ki vključujejo tudi pretočno citometrijo in mikrobiomsko analizo na osnovi sekvenciranja gena 16S rRNA ter so bili predstavljeni na 8. mednarodni konferenci IMEKOFOODS (Ljubljana, 23. september 2025).

Kjer so bile posamezne metode dejansko uporabljene in ovrednotene v okviru projekta AGROTUR+, je to v besedilu posebej označeno. Na ta način dokument jasno razlikuje med mednarodno uveljavljenimi priporočili ter rezultati, pridobljenimi v okviru raziskovalnega dela projekta AGROTUR+ na vzorcih terana z območja Krasa.[3][4]

---

[1] D.2.1.1 Poročilo o dobrih praksah mikrobiologije vina teran (AGROTUR+, WP2, UNG, 2026) – sintezna preglednica in empirični rezultati vzorčenja AGROTUR

[2] AGROTUR+ – projektna spletna stran (Program sodelovanja Interreg VI-A Italija–Slovenija). https://www.ita-slo.eu/en/agrotur

[3] Agrotur terani 2024–2025 – analitski podatki (fizikalno-kemijske, biogene amine, hlapni fenoli, mikrobiomska analiza; N = 48 vzorcev letnikov 2023 in 2024). Interno gradivo projekta AGROTUR+ (WP2), Univerza v Novi Gorici, 2025.

[4] Butinar, L. Microbial Spoilage Risks in Teran Wine: Tracking Brettanomyces and Biogenic Amines During Malolactic Fermentation. Predstavitev, 8. mednarodna konferenca IMEKOFOODS, Ljubljana, 23. 9. 2025.

1.3 Diseminacija: praktična delavnica in digitalna platforma

V skladu s prijavnico projekta so bile smernice tega dokumenta predstavljene pridelovalcem in strokovni javnosti na praktični delavnici »Uporaba naprednih pristopov za mikrobiološki monitoring v vinarstvu«, ki je potekala 28. maja 2025 na dvorcu Lanthieri v Vipavi v okviru poletne šole AGROTUR+. Na delavnici sta L. Butinar in T. Radovanović Vukajlović (UNG) predstavili spremljanje mlečnokislinskih bakterij in kvarne kvasovke *Brettanomyces bruxellensis* v vinih PTP Teran, K. Lisjak (KIS) pa priložnosti in omejitve malolaktične fermentacije. Obravnavane vsebine neposredno podpirajo kontrolni točki KT3 (malolaktična fermentacija) in KT4 (spremljanje kvarnih mikroorganizmov), predstavljeni v poglavju 4. Delavnica je vključevala tudi praktično predstavitev pretočne citometrije ter klasičnih mikrobioloških metod v Centru za raziskave vina Univerze v Novi Gorici. Gradiva delavnice so dostopna udeležencem prek platforme *winecider.net*, kjer bodo smernice objavljene tudi v obliki uporabniku prilagojenih navodil (D.2.1.3). Rezultati projekta in pripravljene smernice bodo dostopni tudi prek platforme *e-karst.eu*, kar bo prispevalo k širši diseminaciji med deležniki na Krasu.[5][6][7]

Status realizacije: Praktična delavnica je bila izvedena v okviru obdobja izvajanja projekta. Gradiva in uporabniku prilagojena navodila (D.2.1.3) so pridelovalcem dostopna prek platforme *winecider.net*, vsebine smernic pa se vključujejo tudi v redni študijski proces Univerze v Novi Gorici, kar zagotavlja njihovo nadaljnjo uporabo po zaključku projekta.[2]

2. Okvir mikrobiološkega monitoringa: dva nivoja nadzora

Smernice razlikujejo med dvema dopolnjujočima se nivojema mikrobiološkega nadzora. Minimalni monitoring zajema osnovne kontrolne točke, usklajene z zahtevami Pravilnika o vinu s priznanim tradicionalnim poimenovanjem Teran, in ga je mogoče izvajati z običajno kletarsko opremo ter uveljavljenimi analitskimi metodami. Napredna mikrobiološka kontrola minimalni monitoring nadgrajuje z dodatnimi mikrobiološkimi in molekularnimi metodami (poglavje 3), ki omogočajo zgodnejše in natančnejše prepoznavanje mikrobioloških tveganj, še preden se ta odrazijo v kemijskih parametrih ali senzoričnih lastnostih vina. Zasnova nivojev nadzora in kontrolnih točk temelji na načelih programa kakovostnih kontrolnih točk (*Quality Points Program*), kot ga opisujeta Fugelsang in Edwards (2007, poglavje 10).[8][9]

2.1 Minimalni monitoring

Minimalni monitoring vključuje vizualni pregled zdravstvenega stanja grozdja ob trgatvi (8. člen Pravilnika), spremljanje poteka alkoholne fermentacije (gostota oziroma vsebnost sladkorja), spremljanje jabolčne in mlečne kisline med malolaktično fermentacijo (encimska analiza ali HPLC), redno določanje vsebnosti SO_2, pH in hlapnih kislin ter zaključno kemijsko in senzorično oceno vina

[5] AWRI – Malolactic fermentation in red wine (Fact sheet). https://www.awri.com.au/files/attachment/mlf-in-red-wine/

[6] AWRI – Preparation of MLF starter culture (procedure). https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/wine_fermentation/mlf-starter-culture/

[7] Reynolds, A. G. (ur.). Managing Wine Quality, Volume 2: Oenology and Wine Quality (Malolactic Fermentation).

[8] Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2007) Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures, 2nd ed. (poglavje 10 – Quality Points Program; poglavji 12–14 – klasične kultivacijske in mikroskopske metode).

[9] Ribéreau-Gayon, P. et al. (2006) Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons.

pred sprostitvijo v promet (12. in 15. člen Pravilnika). Ta nivo predstavlja priporočeno osnovo za zagotavljanje skladnosti z zahtevami Pravilnika o vinu s priznanim tradicionalnim poimenovanjem Teran, vendar ne omogoča zgodnjega odkrivanja specifičnih mikrobioloških tveganj, kot sta določitev sestave populacije mlečnokislinskih bakterij ali zgodnje zaznavanje *B. bruxellensis*.[10][11]

2.2 Napredna mikrobiološka kontrola

Napredna mikrobiološka kontrola je priporočljiva zlasti pri: (a) ponavljajočih se težavah z zapoznelo ali neuspešno zaključeno malolaktično fermentacijo; (b) sumu na povečano tveganje za tvorbo biogenih aminov ali prisotnost *B. bruxellensis*; (c) uvajanju novih starter kultur ali spremembah tehnologije pridelave vina; ter (d) vzpostavljanju lastne referenčne baze avtohtonih oziroma lokalno prilagojenih sevov, značilnih za kraško vinorodno območje. Metode napredne mikrobiološke kontrole so podrobneje opisane v poglavju 3, njihova uporaba po posameznih kontrolnih točkah pa v poglavju 4.[12][13][14][15][16]

3. Analitske metode napredne mikrobiološke kontrole

3.1 Klasične kultivacijske metode

Klasične kultivacijske metode, ki temeljijo na gojenju mikroorganizmov na selektivnih trdnih gojiščih (ploščna metoda), ostajajo referenčni standard za dokazovanje živih in kultivabilnih mikroorganizmov ter pomemben del mikrobiološke kontrole vina, zlasti pri potrjevanju mikrobiološke stabilnosti pred stekleničenjem. Njihova glavna omejitev je časovna zahtevnost, saj inkubacija in štetje kolonij običajno trajata od 5 do 14 dni, izolacija čiste kulture in identifikacija vrste pa lahko podaljšata analizo tudi na več tednov. Zaradi tega metode niso primerne za hitro operativno odločanje med potekom fermentacije. Dodatna omejitev je, da ne zaznajo celic v stanju VBNC (*viable but non-culturable*; živih, vendar nekultivabilnih celic), ki lahko ob ugodnih pogojih ponovno postanejo presnovno aktivne in povzročijo mikrobiološko nestabilnost vina.[4][8][17]

---

[10] Pravilnik o vinu s priznanim tradicionalnim poimenovanjem Teran, Uradni list RS, št. 205/2021, akt št. 4215. https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2021-01-4215?sop=2021-01-4215

[11] Specifikacija proizvoda za zaščiteno označbo porekla (ZOP) Kras, register eAmbrosia, Evropska komisija. https://ec.europa.eu/geographical-indications-register/eambrosia-public-api/api/v1/attachments/6778

[12] OIV – Code of good vitivinicultural practices in order to avoid or limit contamination by Brettanomyces. https://www.oiv.int/node/3239

[13] OIV – Code of good vitivinicultural practices in order to minimise the presence of biogenic amines in vine products. https://www.oiv.int/node/3311

[14] AWRI – Wine Microorganism Culture Collection (AWMCC). https://www.awri.com.au/research_and_development/wine-microorganism/

[15] AWRI – Technical Note: Options for detecting Brettanomyces in wine. https://www.awri.com.au/information_services/technical_review/technical-notes/technical-note-options-for-detecting-brettanomyces-in-wine/

[16] AWRI – Brettanomyces Fact Sheet. https://www.awri.com.au/files/attachment/brett-fact-sheet/

[17] OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Annex A, Section 4 – Microbiological Analysis. https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-4-microbiological-analysis

3.2 Pretočna citometrija (FCM)

V okviru projekta AGROTUR+ sta bila za pretočno citometrijo (*flow cytometry*, FCM) preizkušena dva komercialna kita reagentov: (1) komplet za kvantifikacijo živih in mrtvih bakterij ter razlikovanje Gram-pozitivnih (LAB) od Gram-negativnih bakterij (AAB), ki omogoča tudi zaznavanje celic v stanju VBNC, ter (2) komplet, specifičen za kvasovko *B. bruxellensis*, ki temelji na tehnologiji FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) z gensko sondo, specifično za tarčno molekulo, in omogoča zaznavanje živih celic *B. bruxellensis*. Rezultati analize so na voljo isti dan, zato je FCM primerna metoda za hitro spremljanje mikrobiološkega stanja vina med malolaktično fermentacijo in zorenjem.

V vzorcih vina PTP Teran letnika 2024 (n = 26) je bila s FCM prisotnost *B. bruxellensis* ugotovljena v treh vzorcih, medtem ko je bilo s klasičnim gojenjem potrjenih le dva od teh primerov. V okviru projekta AGROTUR+ je pretočna citometrija omogočila hitrejše zaznavanje mlečnokislinskih bakterij med malolaktično fermentacijo ter zgodnje odkrivanje prisotnosti kvarnih kvasovk, kar omogoča pravočasno ukrepanje še pred pojavom senzorično zaznavnega kvarjenja vina.[4]

3.3 Kvantitativni PCR (qPCR)

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) omogoča hitro (v nekaj urah do enega dne) in zelo specifično določanje tarčnih mikroorganizmov ali genov. V mikrobiološki kontroli vina se najpogosteje uporablja za določanje *B. bruxellensis* (referenčna metoda OIV tipa IV) ter za usmerjeno presejanje genov, povezanih z nastajanjem biogenih aminov (npr. *hdc*, *tyrdc*, *odc* in *agdi*) pri sevih mlečnokislinskih bakterij. Prisotnost teh genov predstavlja pokazatelj potencialnega tveganja za tvorbo biogenih aminov, še preden se ti pojavijo v merljivih koncentracijah. Metoda zahteva uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov in ustrezne laboratorijske opreme, zato je najprimernejša kot usmerjena analiza ob sumu na povečano mikrobiološko tveganje, ugotovljenem z drugimi metodami (npr. pretočno citometrijo ali kemijsko analizo). Ker qPCR zaznava DNA, pozitiven rezultat ne pomeni nujno prisotnosti presnovno aktivnih oziroma živih celic.[18]

3.4 Mikrobiomska analiza (sekvenciranje gena 16S rRNA)

Mikrobiomska analiza je nekultivabilna metoda, pri kateri se DNA izolira neposredno iz vzorca vina, sestava bakterijske združbe pa se določi s tarčnim sekvenciranjem PCR-amplikonov gena 16S rRNA z uporabo tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (*next-generation sequencing*, NGS). Metoda ne določa absolutnega števila celic, omogoča pa natančno določitev relativne zastopanosti posameznih bakterijskih taksonov, vključno z redkimi ali nepričakovanimi vrstami, ki jih s klasičnimi kultivacijskimi metodami pogosto ni mogoče zaznati.

V AGROTUR+ projektu je bila metoda uporabljena kot orodje za pojasnitev vzroka nezaključene malolaktične fermentacije. Pri dveh od štirih neskladnih vzorcev vina PTP Teran letnika 2023 bakterija *Oenococcus oeni* ni bila zaznana, analiza pa je hkrati pokazala prisotnost drugih mlečnokislinskih bakterij s potencialnim vplivom na kakovost vina, med njimi *Pediococcus parvulus* (povezan s tvorbo

[18] OIV – Enumerating yeasts of the species Brettanomyces bruxellensis using qPCR (Type IV). https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-4-microbiological-analysis/enumerating-yeasts-of-the-species-brettanomyces-bruxellensis-using-qpcr-(type-iv)

eksopolisaharidov, ki lahko povzročijo vlečljivost oziroma oljavost vina, ter pri nekaterih sevih tudi s tveganjem za tvorbo biogenih aminov), *Lactobacillus paracollinoides* in *Lactobacillus harbinensis*, ter dveh vrst ocetnokislinskih bakterij (*Gluconobacter cerinus* in *Komagataeibacter adhaesivum*).[4][19]

3.5 Primerjava metod po kontrolnih točkah

Preglednica 1: Primerjava analitskih metod za mikrobiološko kontrolo terana.

Metoda	Čas do rezultata	Kaj zazna	Prednosti / omejitve	Primerna kontrolna točka
Klasične kultivacijske metode (ploščna metoda)	5–14 dni; identifikacija vrste lahko traja več tednov	Živi, kultivabilni mikroorganizmi	Referenčni standard za dokazovanje živih mikroorganizmov; razmeroma nizki stroški; časovno zahtevna, ne zazna celic v stanju VBNC	KT5 – potrditev mikrobiološke stabilnosti pred stekleničenjem
Pretočna citometrija (FCM)	Isti dan (nekaj ur)	Žive in mrtve bakterijske celice, Gram-pozitivne/Gram-negativne bakterije, celice v stanju VBNC; ob uporabi FISH tudi *Brettanomyces bruxellensis*	Hitra analiza, omogoča kvantifikacijo in zaznavanje celic v stanju VBNC; zahteva namensko opremo in ustrezne reagente	KT2, KT3, KT4 – spremljanje mikrobiološkega stanja med alkoholno fermentacijo, malolaktično fermentacijo in zorenjem
Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)	Nekaj ur do enega dne	Tarčni mikroorganizmi oziroma geni (npr. *B. bruxellensis*, *hdc*, *tyrdc*, *odc*, *agdi*)	Zelo specifična in občutljiva metoda; zahteva specifične začetne oligonukleotide in namensko opremo; zazna tudi DNA neživih celic	KT3, KT4 – usmerjeno presejanje ob sumu na povečano mikrobiološko tveganje
Mikrobiomska analiza (sekvenciranje gena 16S rRNA / NGS)	Nekaj dni do 2-3 tedne	Relativna sestava bakterijske združbe (vse zaznane vrste)	Celovit vpogled v bakterijsko združbo, omogoča zaznavanje tudi nepričakovanih vrst; ne določa absolutnega števila celic, metoda je časovno in stroškovno zahtevnejša	KT3 – pojasnitev vzroka nezaključene MLF

[19] Bartowsky, E., Bauer, F. et al. Molecular Wine Microbiology.

4. Kontrolne točke in odločitvene matrike (»če … potem …«)

V tem poglavju je proizvodni proces terana razdeljen na pet zaporednih kontrolnih točk (KT1–KT5). Za vsako kontrolno točko je opredeljeno, kaj spremljati, kateri pogoj (»če«) sproži ukrep (»potem«) ter s katero metodo (minimalni ali napredni nivo, glej poglavje 3) se pogoj preverja. Matrike neposredno nadgrajujejo sintezno preglednico iz D.2.1.1 (poglavje 10) in so – kjer je navedeno – podprte z empiričnimi rezultati lastnega vzorčenja AGROTUR+ (D.2.1.1, poglavje 9).

4.1 KT1 – Sprejem grozdja in mošta

Če (pogoj / opozorilni signal)	Potem (ukrep)	Priporočena metoda	Vir/standard
Delež poškodovanega/okuženega grozdja > 10 % ob trgatvi (čl. 8 Pravilnika)	Sortiranje grozdja, hitrejši transport in predelava, po potrebi prilagojen odmerek SO_2 v okviru dovoljenih enoloških postopkov	Minimalni: vizualni pregled in ocena deleža poškodovanega grozdja	Pravilnik PTP Teran čl. 8(2); OIV Code – sound vitivinicultural practices (node 3451)
Visoka začetna mikrobna obremenitev mošta (sum na povečano populacijo kvarnih kvasovk/bakterij)	Rezultate FCM ovrednotiti skupaj z zdravstvenim stanjem grozdja, pH mošta in drugimi tehnološkimi parametri; na tej podlagi po potrebi prilagoditi odmerjanje SO_2 ter pogoje hladne maceracije.	Napredni: pretočna citometrija (FCM) mošta	AWRI technical notes; Butinar, IMEKOFOODS 2025

4.2 KT2 – Alkoholna fermentacija

Če (pogoj / opozorilni signal)	Potem (ukrep)	Priporočena metoda	Vir/standard
Upočasnjen ali zaustavljen padec sladkorja (sum na zastoj alkoholne fermentacije)	Preveriti temperaturo in razpoložljiv asimilabilni dušik (YAN), po potrebi ponovna inokulacija s selekcioniranim sevom *S. cerevisiae*	Minimalni: spremljanje gostote/reducirajočih sladkorjev	Pravilnik PTP Teran čl. 11(3); Handbook of Enology Vol. 1
FCM med fermentacijo pokaže padec viabilnosti *S. cerevisiae* ali prisotnost *Brettanomyces* oz. drugih potencialno kvarnih kvasovk	Preveriti vzroke zmanjšane viabilnosti (temperatura, hranila, vsebnost kisika, prisotnost drugih potencialno kvarnih mikroorganizmov); po potrebi prilagoditi fermentacijske pogoje	Napredni: pretočna citometrija (FCM)	Butinar, IMEKOFOODS 2025

4.3 KT3 – Malolaktična fermentacija (MLF)

Če (pogoj / opozorilni signal)	Potem (ukrep)	Priporočena metoda	Vir/standard
Jabolčna kislina po pričakovanem času ne upada oziroma mlečna kislina ne dosega dinamike, potrebne za doseganje najmanj 1 g/l mlečne kisline v končnem vinu	Po priporočilih AWRI so koncentracije SO_2 pod približno 30 mg/l praviloma ugodne, koncentracije nad približno 40 mg/l pa lahko zavirajo MLF; preveriti tudi temperaturo vina (18–22 °C); po potrebi inokulacija z aklimatizirano kulturo *O. oeni*	Minimalni: encimska/HPLC analiza jabolčne in mlečne kisline	Pravilnik PTP Teran čl. 11(4), 12; OIV Kodeks enoloških postopkov (spis 3.1.2.3); AWRI MLF guidelines
16S rRNA / FCM pokaže odsotnost *O. oeni* ali prevlado LAB rodov s tveganjem dekarboksilazne aktivnosti (npr. *Pediococcus*, *Lactobacillus*)	Ponovna inokulacija s preverjenim sevom *O. oeni*, če so izpolnjeni tudi drugi pogoji za uspešno MLF; po potrebi qPCR presejanje na dekarboksilazne gene pred nadaljevanjem procesa	Napredni: mikrobiomska analiza (16S rRNA/NGS), FCM, qPCR	Butinar, IMEKOFOODS 2025
Zvišana koncentracija biogenih aminov (histamin) v vmesnem vzorcu med/po MLF	Preveriti vzrok povišanih koncentracij histamina (sestava populacije LAB), okrepiti higienske ukrepe ter pri naslednjem letniku uporabiti sev LAB brez oziroma z nizko dekarboksilazno aktivnostjo.	Napredni: kromatografska analiza biogenih aminov; qPCR na gene *hdc/tyrdc/odc*	OIV – Code of good vitivinicultural practices – biogenic amines (node 3311); AGROTUR+: glej D.2.1.1, poglavje 9.4

4.4 KT4 – Zorenje in skladiščenje pred stekleničenjem

Če (pogoj / opozorilni signal)	Potem (ukrep)	Priporočena metoda	Vir/standard
FCM (s FISH kitom) ali klasično gojenje potrdi prisotnost *B. bruxellensis*	Po potrebi vzdrževanje ustrezne vsebnosti prostega SO_2 ter hladnejše skladiščenje (< 12 °C), po potrebi klarifikacija oziroma filtracija pred stekleničenjem.	Napredni: FCM s FISH kitom (hitrejša in bolj specifična detekcija kot klasično gojenje – glej poglavje 3.2)	OIV Code – Brettanomyces (node 3239); AWRI Brett detection; AGROTUR+: glej D.2.1.1, poglavje 9.6
Koncentracija 4-etilgvajakola presega	Potrditi prisotnost *B. bruxellensis* z ustrezno	Minimalni: kromatografska	Yang et al., 2021 (prag 4-EG); AGROTUR+:

spodnjo mejo senzoričnega pragu (100–160 µg/L)	mikrobiološko metodo (FCM, qPCR ali gojenje). Če prisotnost B. bruxellensis ni potrjena, preveriti tudi možnost prispevka drugih kvarnih mikroorganizmov ter prilagoditi vsebnost prostega SO_2 in spremljati mikrobiološko stabilnost do stekleničenja.	analiza hlapnih fenolov	glej D.2.1.1, poglavje 9.6

4.5 KT5 – Predkontrola pred uradno oceno in stekleničenjem

Če (pogoj / opozorilni signal)	Potem (ukrep)	Priporočena metoda	Vir/standard
Odstopanje kemijskih parametrov od specifikacije PTP Teran (mlečna kislina < 1 g/l, hlapne kisline > 1,0 g/l, organoleptična ocena < 16,5 t.)	Izvesti klasično mikrobiološko analizo z gojenjem kot referenčno metodo za potrditev mikrobiološke stabilnosti pred stekleničenjem.	Minimalni: interna kemijska in senzorična kontrola	Pravilnik PTP Teran čl. 12, 15
Zaključna mikrobiološka kontrola potrdi prisotnost živih mikroorganizmov	Klasično gojenje kot referenčni standard za dokončno potrditev mikrobiološke stabilnosti pred stekleničenjem	Minimalni/referenčni: gojenje na selektivnih gojiščih (OIV-MA-AS4-01)	OIV Compendium, sect. 4 (OIV-MA-AS4-01); AWRI Wine Microorganism Culture Collection

5. Sintezna preglednica pragov tveganja

Spodnja preglednica združuje ključne referenčne vrednosti, uporabljene v odločitvenih matrikah poglavja 4. Preglednica vključuje zakonske zahteve, strokovna priporočila in senzorične pragove iz mednarodne literature ter jih, kjer je to relevantno, dopolnjuje z rezultati mikrobiološkega spremljanja, izvedenega v okviru projekta AGROTUR+.[20]

Preglednica 2: Referenčne vrednosti za mikrobiološko kontrolo vina PTP Teran.

Parameter	Referenčna vrednost / zahteva	Izvor	Rezultati AGROTUR+ (glej D.2.1.1)
Mlečna kislina	≥ 1 g/L	Pravilnik PTP Teran čl. 12	1,00–1,77 g/L (2024); skladnost se je izboljšala z 86,4 % (2023) na 100 % (2024)

[20] Yang, J. et al. (2021). Sensory thresholds of volatile phenols (4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol) in wine.

Hlapne kisline	≤ 1,0 g/L	Pravilnik PTP Teran čl. 12	0,28–1,02 g/L; 1 od 48 vzorcev (2,1 %) je presegel mejno vrednost
Preostanek jabolčne kisline (indikator zaključene MLF)	< 0,1–0,2 g/L (blizu meje določljivosti metode)	Analitska referenčna vrednost	0–3,21 g/L (2023) in 0–0,16 g/L (2024); štirje vzorci letnika 2023 niso imeli zaključene MLF.
SO_2 med MLF	pod približno 30 mg/L praviloma ugodno; nad približno 40 mg/L lahko zaviralno; nad 50–60 mg/L izrazito zaviralno	AWRI MLF guidelines	Skupni SO_2: 19–58 mg/L.
Histamin	2–10 mg/L (orientacijska nacionalna priporočila nekaterih držav EU; v EU ni enotne zakonske mejne vrednosti za vino)	OIV – Code of good vitivinicultural practices, biogenic amines (node 3311); nacionalna priporočila držav članic EU	Razpon 2,02–35,66 mg/L; povprečna koncentracija 21,86 mg/L. V delu analiziranih vzorcev so bile koncentracije nad orientacijskimi nacionalnimi priporočili.
4-etilgvajakol (4-EG)	100–160 µg/L (objavljeni senzorični prag)	Yang et al., 2021	4/48 vzorcev (8,3 %) nad spodnjo mejo pragu
4-etilfenol (4-EP)	440–620 µg/L (objavljeni senzorični prag)	Yang et al., 2021	0–134,0 µg/L – vsi vzorci pod pragom

6. Priporočena pogostost vzorčenja in časovnica napredne kontrole

Preglednica 3: Priporočena časovnica vzorčenja in napredne mikrobiološke kontrole po kontrolnih točkah.

Kontrolna točka	Minimalni monitoring	Napredna kontrola (kadar je indicirana, glej poglavje 2.2)
KT1 – Sprejem grozdja in mošta	Ob vsakem sprejemu (vizualni pregled zdravstvenega stanja)	FCM mošta pri sumu na povečano mikrobno obremenitev ali povečano tveganje za mikrobiološko kvarjenje
KT2 – Alkoholna fermentacija	Dnevno spremljanje gostote oziroma vsebnosti sladkorja	FCM po potrebi pri upočasnjeni fermentaciji, zmanjšani viabilnosti kvasovk ali sumu na prisotnost potencialno kvarnih mikroorganizmov.
KT3 – MLF	Tedensko spremljanje jabolčne in mlečne kisline	FCM oziroma mikrobiomska analiza (sekvenciranje gena 16S rRNA) pri zapozneli ali neuspešni MLF (npr. brez pričakovanega upada jabolčne kisline po 3–4 tednih); qPCR

		pri sumu na povečano tveganje za tvorbo biogenih aminov.
KT4 – Zorenje/skladiščenje pred stekleničenjem	Občasno spremljanje SO_2 ter senzorična kontrola vina	FCM (s FISH za *B. bruxellensis*) in/ali kromatografska analiza hlapnih fenolov ob sumu na mikrobiološko kvarjenje oz. pred daljšim zorenjem ali stekleničenjem.
KT5 – Pred stekleničenjem	Obvezna interna kemijska in senzorična kontrola pred oddajo vina v uradno ocenjevanje	Klasične kultivacijske metode (gojenje na selektivnih gojiščih) za potrditev mikrobiološke stabilnosti vina pred stekleničenjem.

7. Prehod v D.2.1.3 – prenos smernic na platformo winecider.net

Odločitvene matrike iz poglavja 4 in sintezna preglednica referenčnih vrednosti (poglavje 5) predstavljajo strokovno podlago za pripravo uporabniku prilagojenih navodil v okviru dosežka D.2.1.3. Vsebina bo na platformi *winecider.net* predstavljena v obliki preglednih kontrolnih seznamov po posameznih fazah pridelave vina (sprejem grozdja, alkoholna fermentacija, malolaktična fermentacija, zorenje vina in preverjanje ustreznosti pred stekleničenjem), preglednic ključnih analitskih parametrov in referenčnih vrednosti ter priporočil za izvajanje osnovnega in naprednega mikrobiološkega monitoringa. Poseben poudarek bo namenjen praktični uporabi priporočil OIV, tehničnih smernic AWRI in zahtev Pravilnika o vinu s priznanim tradicionalnim poimenovanjem Teran pri vsakodnevnem delu pridelovalcev.

V okviru D.2.1.3 bodo smernice pripravljene kot statična digitalna in tiskljiva vsebina, dopolnjena z zbirko strokovnih virov ter izobraževalnimi gradivi za pridelovalce.

Poleg platforme *winecider.net* bodo smernice in ključni rezultati, skladno z načrtom diseminacije projekta AGROTUR+, dostopni tudi prek platforme *e-karst.eu*, kar bo prispevalo k njihovi širši dostopnosti med pridelovalci ter strokovno javnostjo na območju Krasa.[21]

8. Zaključek

Smernice v tem dokumentu povezujejo osnovni monitoring, potreben za zagotavljanje skladnosti z zahtevami Pravilnika o vinu s priznanim tradicionalnim poimenovanjem Teran, z naprednimi analitskimi metodami (pretočna citometrija, qPCR in mikrobiomska analiza z uporabo sekvenciranja gena 16S rRNA), ki so bile v okviru projekta AGROTUR+ uporabljene pri spremljanju mikrobiološke kakovosti vin PTP Teran. Izbrane metode omogočajo hitrejše odkrivanje oziroma podrobnejšo opredelitev mikrobioloških tveganj v primerjavi s klasičnimi kultivacijskimi metodami, zlasti pri spremljanju malolaktične fermentacije, oceni tveganja za tvorbo biogenih aminov ter zaznavanju prisotnosti Brettanomyces bruxellensis. Odločitvene matrike po kontrolnih točkah (poglavje 4) in sintezna

[21] AGROTUR+ – Teran Academy and Karst products (novica s projektnimi rezultati). https://www.ita-slo.eu/en/news-and-events/news/teran-academy-and-karst-products

preglednica referenčnih vrednosti (poglavje 5) predstavljajo operativno jedro dokumenta ter strokovno podlago za pripravo uporabniku prilagojenih navodil v okviru dosežka D.2.1.3 za platformo winecider.net.

Te smernice niso nadomestilo za veljavno zakonodajo, temveč podporno strokovno orodje, ki pridelovalcem in kletarskemu osebju pomaga načrtovati in izvajati mikrobiološki monitoring ter po potrebi smiselno dopolniti osnovne analize z naprednimi mikrobiološkimi metodami za zgodnje prepoznavanje in obvladovanje mikrobioloških tveganj.

Interreg Italia-Slovenija AGROTUR+

Cofinanziato dall'Unione europea
Sofinancira Evropska unija

D.2.1.2
Linee guida per il controllo microbiologico avanzato dei vini del Carso

Lorena Butinar, Branka Mozetič Vodopivec

Vipava, Dicembre 2025

D.2.1.2
Smernice za napredno mikrobiološko kontrolo kraških vin

Lorena Butinar, Branka Mozetič Vodopivec

Vipava, december 2025

Partner di progetto/Projektni partnerji:

Kmetijski inštitut Slovenije
Agricultural Institute of Slovenia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

CERCOT

ORA

Il progetto AGROTUR+ è co-finanziato dall'Unione europea nell'ambito del Programma Interreg VI-A Italia-Slovenia.
Projekt AGROTUR sofinancira Evropska unija v okviru Programa Interreg VI-A Italija-Slovenija.

www.ita-slo.eu/agrotur

Indice

1. Introduzione 3
1.1 Finalità, obiettivi e collocazione nella catena D.2.1.1–D.2.1.3 3
1.2 Metodologia e fonti 3
1.3 Disseminazione: workshop pratico e piattaforma digitale 4
2. Quadro del monitoraggio microbiologico: due livelli di controllo 4
2.1 Monitoraggio minimo 5
2.2 Controllo microbiologico avanzato 5
3. Metodi analitici del controllo microbiologico avanzato 5
3.1 Metodi di coltura classici 5
3.2 Citometria a flusso (FCM) 6
3.3 PCR quantitativa (qPCR) 6
3.4 Analisi del microbioma (sequenziamento del gene 16S rRNA) 7
3.5 Confronto dei metodi per punto di controllo 7
4. Punti di controllo e matrici decisionali («se … allora …») 8
4.1 KT1 – Ricevimento dell'uva e del mosto 8
4.2 KT2 – Fermentazione alcolica 9
4.3 KT3 – Fermentazione malolattica (FML) 9
4.4 KT4 – Maturazione e stoccaggio prima dell'imbottigliamento 10
4.5 KT5 – Controllo preliminare prima della valutazione ufficiale e dell'imbottigliamento 10
5. Tabella sintetica delle soglie di rischio 11
6. Frequenza di campionamento consigliata e tempistica del controllo avanzato 12
7. Passaggio a D.2.1.3 – trasferimento delle linee guida sulla piattaforma winecider.net 13
8. Conclusioni 13

1. Introduzione

1.1 Finalità, obiettivi e collocazione nella catena D.2.1.1–D.2.1.3

La relazione D.2.1.1 **Relazione sulle buone pratiche di microbiologia del vino Teran** ha riunito gli standard internazionali (OIV, AWRI), la letteratura scientifica e i risultati del monitoraggio microbiologico condotto nell'ambito del progetto AGROTUR+, in una tabella sintetica *buona pratica – rischio – misura di controllo – standard di riferimento ovvero base normativa* (D.2.1.1, capitolo 10) e ha individuato quattro gruppi chiave di rischi microbiologici nella produzione del vino DOP Teran (D.2.1.1, capitolo 11.1).

Il presente documento (D.2.1.2) sviluppa questi risultati in linee guida operative per il controllo microbiologico. Per ciascun punto di controllo chiave del processo produttivo (ricevimento dell'uva, fermentazione alcolica, fermentazione malolattica, maturazione del vino e verifica di conformità prima dell'imbottigliamento) definisce i parametri di monitoraggio, i metodi consigliati (livello di controllo di base o avanzato) e le misure consigliate in caso di deviazioni riscontrate ovvero di superamento delle soglie di allarme. Le linee guida sono presentate sotto forma di matrici decisionali del tipo «se … allora …»).[1]

D.2.1.2 rappresenta il secondo anello della catena di tre risultati correlati del work package WP2. Il documento D.2.1.1 offre una rassegna delle conoscenze e delle buone pratiche esistenti, D.2.1.2 trasforma questi risultati in matrici decisionali operative per il controllo microbiologico avanzato, mentre D.2.1.3 le sviluppa ulteriormente in istruzioni adattate all'utente per la piattaforma *winecider.net*.[2]

1.2 Metodologia e fonti

Le linee guida si basano su: (1) la tabella sintetica e le conclusioni della relazione D.2.1.1; (2) gli standard internazionali OIV (*Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts*) e sulle raccomandazioni tecniche AWRI per i metodi microbiologici e analitici avanzati; e (3) sui risultati del controllo microbiologico avanzato condotto nell'ambito del progetto AGROTUR+ su campioni di vino DOP Teran, che comprendono anche la citometria a flusso e l'analisi del microbioma basata sul sequenziamento del gene 16S rRNA, presentati alla 8ª conferenza internazionale IMEKOFOODS (Lubiana, 23 settembre 2025).

Laddove i singoli metodi sono stati effettivamente utilizzati e valutati nell'ambito del progetto AGROTUR+, ciò è indicato specificamente nel testo. In questo modo il documento distingue chiaramente tra le raccomandazioni internazionalmente riconosciute e i risultati ottenuti nell'ambito del lavoro di ricerca del progetto AGROTUR+ su campioni di Teran della zona del Carso.[3][4]

---

[1] D.2.1.1 Relazione sulle buone pratiche di microbiologia del vino Teran (AGROTUR+, WP2, UNG, 2026) – tabella sintetica e risultati empirici del campionamento AGROTUR

[2] AGROTUR+ – sito web del progetto (Programma di Cooperazione Interreg VI-A Italia–Slovenia). https://www.ita-slo.eu/en/agrotur

[3] Agrotur terani 2024–2025 – dati analitici (parametri fisico-chimici, ammine biogene, fenoli volatili, analisi del microbioma; N = 48 campioni delle annate 2023 e 2024). Materiale interno del progetto AGROTUR+ (WP2), Università di Nova Gorica, 2025.

[4] Butinar, L. Microbial Spoilage Risks in Teran Wine: Tracking Brettanomyces and Biogenic Amines During Malolactic Fermentation. Presentazione, 8ª conferenza internazionale IMEKOFOODS, Lubiana, 23.9.2025.

1.3 Disseminazione: workshop pratico e piattaforma digitale

In conformità con il modulo di candidatura del progetto, le linee guida di questo documento sono state presentate ai produttori e al pubblico specialistico nel workshop pratico «Uso di approcci avanzati per il monitoraggio microbiologico in enologia», svoltosi il 28 maggio 2025 presso il castello di Lanthieri a Vipava nell'ambito della Summer School AGROTUR+. Nel corso del workshop, L. Butinar e T. Radovanović Vukajlović (UNG) hanno presentato il monitoraggio dei batteri lattici e del lievito alterante *Brettanomyces bruxellensis* nei vini DOP Teran, mentre K. Lisjak (KIS) ha presentato le opportunità e i limiti della fermentazione malolattica. I contenuti trattati supportano direttamente i punti di controllo KT3 (fermentazione malolattica) e KT4 (monitoraggio dei microrganismi alteranti), presentati nel capitolo 4. Il workshop ha incluso anche una dimostrazione pratica della citometria a flusso e dei metodi microbiologici classici presso il Centro di Ricerca sul Vino dell'Università di Nova Gorica. I materiali del workshop sono disponibili ai partecipanti tramite la piattaforma *winecider.net*, dove le linee guida saranno pubblicate anche sotto forma di istruzioni adattate all'utente (D.2.1.3). I risultati del progetto e le linee guida elaborate saranno accessibili anche tramite la piattaforma *e-karst.eu*, il che contribuirà a una più ampia disseminazione tra gli stakeholder del Carso.[5][6][7]

Stato di realizzazione: Il workshop pratico è stato realizzato nel periodo di attuazione del progetto. I materiali e le istruzioni adattate all'utente (D.2.1.3) sono accessibili ai produttori tramite la piattaforma *winecider.net*, mentre i contenuti delle linee guida vengono integrati anche nel regolare percorso di studio dell'Università di Nova Gorica, garantendo il loro utilizzo continuativo dopo la conclusione del progetto.[2]

2. Quadro del monitoraggio microbiologico: due livelli di controllo

Le linee guida distinguono tra due livelli complementari di controllo microbiologico. Il monitoraggio minimo comprende i punti di controllo di base, in linea con i requisiti del Regolamento sul vino con denominazione tradizionale riconosciuta Teran, ed è realizzabile con l'attrezzatura enologica standard e i metodi analitici consolidati. Il controllo microbiologico avanzato integra il monitoraggio minimo con metodi microbiologici e molecolari aggiuntivi (capitolo 3), che consentono un'individuazione più precoce e precisa dei rischi microbiologici, prima che questi si manifestino nei parametri chimici o nelle caratteristiche sensoriali del vino. L'impostazione dei livelli di controllo e dei punti di controllo si basa sui principi del programma dei punti di controllo di qualità (*Quality Points Program*), come descritto da Fugelsang e Edwards (2007, capitolo 10).[8][9]

---

[5] AWRI – Malolactic fermentation in red wine (Fact sheet). https://www.awri.com.au/files/attachment/mlf-in-red-wine/

[6] AWRI – Preparation of MLF starter culture (procedure). https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/wine_fermentation/mlf-starter-culture/

[7] Reynolds, A. G. (a cura di). Managing Wine Quality, Volume 2: Oenology and Wine Quality (Malolactic Fermentation).

[8] Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2007) Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures, 2nd ed. (capitolo 10 – Quality Points Program; capitoli 12–14 – metodi di coltura classici e microscopici).

[9] Ribéreau-Gayon, P. et al. (2006) Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons.

2.1 Monitoraggio minimo

Il monitoraggio minimo comprende l'esame visivo dello stato sanitario dell'uva al momento della vendemmia (art. 8 del Regolamento), il monitoraggio dell'andamento della fermentazione alcolica (densità ovvero contenuto di zucchero), il monitoraggio dell'acido malico e lattico durante la fermentazione malolattica (analisi enzimatica o HPLC), la determinazione regolare del contenuto di SO_2, del pH e dell'acidità volatile, nonché la valutazione chimica e sensoriale finale del vino prima della messa in commercio (artt. 12 e 15 del Regolamento). Questo livello costituisce la base consigliata per garantire la conformità ai requisiti del Regolamento sul vino con denominazione tradizionale riconosciuta Teran, ma non consente l'individuazione precoce di rischi microbiologici specifici, come la determinazione della composizione della popolazione di batteri lattici o la rilevazione precoce di *B. bruxellensis*.[10][11]

2.2 Controllo microbiologico avanzato

Il controllo microbiologico avanzato è consigliato in particolare nei seguenti casi: (a) problemi ricorrenti con la fermentazione malolattica ritardata o non completata con successo; (b) sospetto di aumento del rischio di formazione di ammine biogene o presenza di *B. bruxellensis*; (c) introduzione di nuove colture starter o modifiche della tecnologia di produzione del vino; e (d) costituzione di una base di riferimento propria di ceppi autoctoni ovvero adattati localmente, caratteristici della zona vinicola del Carso. I metodi del controllo microbiologico avanzato sono descritti in maggior dettaglio nel capitolo 3, mentre il loro utilizzo per singolo punto di controllo è illustrato nel capitolo 4.[12][13][14][15][16]

3. Metodi analitici del controllo microbiologico avanzato

3.1 Metodi di coltura classici

I metodi di coltura classici, basati sulla coltivazione dei microrganismi su terreni solidi selettivi (metodo delle piastre), restano lo standard di riferimento per dimostrare la presenza di microrganismi vivi e coltivabili e costituiscono una parte importante del controllo microbiologico del vino, in particolare nella conferma della stabilità microbiologica prima dell'imbottigliamento. Il loro limite principale è la

---

[10] Regolamento sul vino con denominazione tradizionale riconosciuta Teran, Gazzetta ufficiale della Repubblica di Slovenia, n. 205/2021, atto n. 4215. https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2021-01-4215?sop=2021-01-4215

[11] Disciplinare di produzione per la denominazione di origine protetta (DOP) Kras, registro eAmbrosia, Commissione europea. https://ec.europa.eu/geographical-indications-register/eambrosia-public-api/api/v1/attachments/6778

[12] OIV – Code of good vitivinicultural practices in order to avoid or limit contamination by Brettanomyces. https://www.oiv.int/node/3239

[13] OIV – Code of good vitivinicultural practices in order to minimise the presence of biogenic amines in vine products. https://www.oiv.int/node/3311

[14] AWRI – Wine Microorganism Culture Collection (AWMCC). https://www.awri.com.au/research_and_development/wine-microorganism/

[15] AWRI – Technical Note: Options for detecting Brettanomyces in wine. https://www.awri.com.au/information_services/technical_review/technical-notes/technical-note-options-for-detecting-brettanomyces-in-wine/

[16] AWRI – Brettanomyces Fact Sheet. https://www.awri.com.au/files/attachment/brett-fact-sheet/

durata: l'incubazione e il conteggio delle colonie richiedono generalmente da 5 a 14 giorni, mentre l'isolamento della cultura pura e l'identificazione della specie possono prolungare l'analisi fino a diverse settimane. Per questo motivo i metodi non sono adatti a decisioni operative rapide durante la fermentazione. Un ulteriore limite è che non rilevano le cellule in stato VBNC (*viable but non-culturable*; cellule vive ma non coltivabili), che in condizioni favorevoli possono tornare metabolicamente attive e causare instabilità microbiologica del vino.[4][8][17]

3.2 Citometria a flusso (FCM)

Nell'ambito del progetto AGROTUR+ sono stati testati per la citometria a flusso (*flow cytometry*, FCM) due kit commerciali di reagenti: (1) un kit per la quantificazione di batteri vivi e morti e per la distinzione tra batteri Gram-positivi (LAB) e Gram-negativi (AAB), che consente anche il rilevamento di cellule in stato VBNC, e (2) un kit specifico per il lievito *B. bruxellensis*, basato sulla tecnologia FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) con sonda genica specifica per la molecola target, che consente il rilevamento delle cellule vive di *B. bruxellensis*. I risultati dell'analisi sono disponibili lo stesso giorno, per cui la FCM è un metodo adeguato per il monitoraggio rapido dello stato microbiologico del vino durante la fermentazione malolattica e la maturazione.

Nei campioni di vino DOP Teran dell'annata 2024 (n = 26), la presenza di *B. bruxellensis* è stata rilevata mediante FCM in tre campioni, mentre con la coltura classica sono stati confermati solo due di questi casi. Nell'ambito del progetto AGROTUR+, la citometria a flusso ha permesso un rilevamento più rapido dei batteri lattici durante la fermentazione malolattica e una individuazione precoce della presenza di lieviti alteranti, consentendo un intervento tempestivo prima che si manifesti un'alterazione percepibile a livello sensoriale.[4]

3.3 PCR quantitativa (qPCR)

La reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR) consente una determinazione rapida (da alcune ore a un giorno) e altamente specifica di microrganismi o geni target. Nel controllo microbiologico del vino viene utilizzata più frequentemente per la determinazione di *B. bruxellensis* (metodo di riferimento OIV di tipo IV) e per lo screening mirato di geni legati alla formazione di ammine biogene (ad es. *hdc*, *tyrdc*, *odc* e *agdi*) nei ceppi di batteri lattici. La presenza di questi geni costituisce un indicatore di rischio potenziale per la formazione di ammine biogene, ancor prima che queste si manifestino in concentrazioni misurabili. Il metodo richiede l'uso di oligonucleotidi iniziali specifici e di attrezzature di laboratorio adeguate, per cui è più indicato come analisi mirata in caso di sospetto di aumento del rischio microbiologico, rilevato con altri metodi (ad es. citometria a flusso o analisi chimica). Poiché la qPCR rileva il DNA, un risultato positivo non implica necessariamente la presenza di cellule metabolicamente attive ovvero vive.[18]

---

[17] OIV Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Annex A, Section 4 – Microbiological Analysis. https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-4-microbiological-analysis

[18] OIV – Enumerating yeasts of the species Brettanomyces bruxellensis using qPCR (Type IV). https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-4-microbiological-analysis/enumerating-yeasts-of-the-species-brettanomyces-bruxellensis-using-qpcr-(type-iv)

3.4 Analisi del microbioma (sequenziamento del gene 16S rRNA)

L'analisi del microbioma è un metodo non colturale, in cui il DNA viene isolato direttamente dal campione di vino e la composizione della comunità batterica viene determinata mediante sequenziamento mirato degli ampliconi PCR del gene 16S rRNA, utilizzando la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (*next-generation sequencing*, NGS). Il metodo non determina il numero assoluto di cellule, ma consente una determinazione precisa dell'abbondanza relativa dei singoli taxa batterici, comprese le specie rare o inattese, spesso non rilevabili con i metodi di coltura classici.

Nel progetto AGROTUR+ il metodo è stato utilizzato come strumento per chiarire la causa della fermentazione malolattica non completata. In due dei quattro campioni non conformi di vino DOP Teran dell'annata 2023, il batterio *Oenococcus oeni* non è stato rilevato, mentre l'analisi ha evidenziato contemporaneamente la presenza di altri batteri lattici con potenziale impatto sulla qualità del vino, tra cui *Pediococcus parvulus* (associato alla formazione di esopolisaccaridi, che possono causare filanza ovvero untuosità del vino, e in alcuni ceppi anche il rischio di formazione di ammine biogene), *Lactobacillus paracollinoides* e *Lactobacillus harbinensis*, e due specie di batteri acetici (*Gluconobacter cerinus* e *Komagataeibacter adhaesivum*).[4][19]

3.5 Confronto dei metodi per punto di controllo

Tabella 1: Confronto dei metodi analitici per il controllo microbiologico del Teran.

Metodo	Tempo di risposta	Cosa rileva	Vantaggi / limiti	Punto di controllo adeguato
Metodi di coltura classici (metodo delle piastre)	5–14 giorni; l'identificazione della specie può richiedere diverse settimane	Microrganismi vivi e coltivabili	Standard di riferimento per la dimostrazione di microrganismi vivi; costi relativamente bassi; richiede tempo, non rileva cellule in stato VBNC	KT5 – conferma della stabilità microbiologica prima dell'imbottigliamento
Citometria a flusso (FCM)	Stesso giorno (alcune ore)	Cellule batteriche vive e morte, batteri Gram-positivi/Gram-negativi, cellule in stato VBNC; con l'uso di FISH anche *Brettanomyces bruxellensis*	Analisi rapida, consente la quantificazione e il rilevamento di cellule in stato VBNC; richiede attrezzature dedicate e reagenti adeguati	KT2, KT3, KT4 – monitoraggio dello stato microbiologico durante la fermentazione alcolica, la fermentazione malolattica e la maturazione
Reazione a catena della polimerasi	Da alcune ore a un giorno	Microrganismi oppure geni target (ad es. *B.*	Metodo molto specifico e sensibile; richiede oligonucleotidi iniziali	KT3, KT4 – screening mirato in caso di

[19] Bartowsky, E., Bauer, F. et al. Molecular Wine Microbiology.

quantitativa (qPCR)		*bruxellensis*, *hdc*, *tyrdc*, *odc*, *agdi*)	specifici e attrezzature dedicate; rileva anche il DNA di cellule non vive	sospetto di aumento del rischio microbiologico
Analisi del microbioma (sequenziamento del gene 16S rRNA / NGS)	Da alcuni giorni a 2-3 settimane	Composizione relativa della comunità batterica (tutte le specie rilevate)	Visione completa della comunità batterica, consente il rilevamento anche di specie inattese; non determina il numero assoluto di cellule, metodo più impegnativo in termini di tempo e costi	KT3 – chiarimento della causa della FML non completata

4. Punti di controllo e matrici decisionali («se … allora …»)

In questo capitolo, il processo produttivo del Teran è suddiviso in cinque punti di controllo consecutivi (KT1–KT5). Per ciascun punto di controllo è definito cosa monitorare, quale condizione («se») attiva la misura («allora») e con quale metodo (livello minimo o avanzato, cfr. capitolo 3) viene verificata la condizione. Le matrici sviluppano direttamente la tabella sintetica di D.2.1.1 (capitolo 10) e sono – dove indicato – supportate dai risultati empirici del campionamento proprio di AGROTUR+ (D.2.1.1, capitolo 9).

4.1 KT1 – Ricevimento dell'uva e del mosto

Se (condizione / segnale di allarme)	Allora (misura)	Metodo consigliato	Fonte/standard
Percentuale di uva danneggiata/infetta > 10% al momento della vendemmia (art. 8 del Regolamento)	Selezione dell'uva, trasporto e lavorazione più rapidi, se necessario dosaggio adeguato di SO_2 nell'ambito delle pratiche enologiche consentite	Minimo: esame visivo e valutazione della percentuale di uva danneggiata	Regolamento DOP Teran art. 8(2); OIV Code – sound vitivinicultural practices (node 3451)
Elevata carica microbica iniziale del mosto (sospetto di aumento della popolazione di lieviti/batteri alteranti)	Valutare i risultati della FCM insieme allo stato sanitario dell'uva, al pH del mosto e ad altri parametri tecnologici; su questa base, se necessario, adeguare il dosaggio di SO_2 e le condizioni della macerazione a freddo.	Avanzato: citometria a flusso (FCM) del mosto	AWRI technical notes; Butinar, IMEKOFOODS 2025

4.2 KT2 – Fermentazione alcolica

Se (condizione / segnale di allarme)	Allora (misura)	Metodo consigliato	Fonte/standard
Calo degli zuccheri rallentato o arrestato (sospetto di arresto della fermentazione alcolica)	Verificare la temperatura e l'azoto assimilabile disponibile (YAN), se necessario reinoculazione con un ceppo selezionato di *S. cerevisiae*	Minimo: monitoraggio della densità/degli zuccheri riducenti	Regolamento DOP Teran art. 11(3); Handbook of Enology Vol. 1
La FCM durante la fermentazione mostra un calo della viabilità di *S. cerevisiae* o la presenza di *Brettanomyces* ovvero di altri lieviti potenzialmente alteranti	Verificare le cause della riduzione della viabilità (temperatura, nutrienti, contenuto di ossigeno, presenza di altri microrganismi potenzialmente alteranti); se necessario adeguare le condizioni di fermentazione	Avanzato: citometria a flusso (FCM)	Butinar, IMEKOFOODS 2025

4.3 KT3 – Fermentazione malolattica (FML)

Se (condizione / segnale di allarme)	Allora (misura)	Metodo consigliato	Fonte/standard
L'acido malico non diminuisce nei tempi previsti ovvero l'acido lattico non raggiunge la dinamica necessaria per ottenere almeno 1 g/l di acido lattico nel vino finito	Secondo le raccomandazioni AWRI, concentrazioni di SO_2 inferiori a circa 30 mg/l sono generalmente favorevoli, mentre concentrazioni superiori a circa 40 mg/l possono inibire la FML; verificare anche la temperatura del vino (18–22 °C); se necessario inoculazione con una cultura acclimatata di *O. oeni*	Minimo: analisi enzimatica/HPLC dell'acido malico e lattico	Regolamento DOP Teran artt. 11(4), 12; Codice OIV delle pratiche enologiche (scheda 3.1.2.3); AWRI MLF guidelines
16S rRNA / FCM rivela l'assenza di *O. oeni* o la prevalenza di generi LAB con rischio di attività decarbossilasica (ad es. *Pediococcus*, *Lactobacillus*)	Reinoculazione con un ceppo verificato di *O. oeni*, se sono soddisfatte anche le altre condizioni per una FML efficace; se necessario screening qPCR sui geni decarbossilasici prima di procedere	Avanzato: analisi del microbioma (16S rRNA/NGS), FCM, qPCR	Butinar, IMEKOFOODS 2025

Concentrazione elevata di ammine biogene (istamina) in un campione intermedio durante/dopo la FML	Verificare la causa delle concentrazioni elevate di istamina (composizione della popolazione LAB), rafforzare le misure igieniche e, nella vendemmia successiva, utilizzare un ceppo LAB privo di attività decarbossilasica ovvero con attività bassa.	Avanzato: analisi cromatografica delle ammine biogene; qPCR sui geni *hdc/tyrdc/odc*	OIV – Code of good vitivinicultural practices – biogenic amines (node 3311); AGROTUR+: cfr. D.2.1.1, capitolo 9.4

4.4 KT4 – Maturazione e stoccaggio prima dell'imbottigliamento

Se (condizione / segnale di allarme)	Allora (misura)	Metodo consigliato	Fonte/standard
La FCM (con kit FISH) o la coltura classica confermano la presenza di *B. bruxellensis*	Se necessario, mantenere un contenuto adeguato di SO_2 libero e uno stoccaggio più fresco (< 12 °C); se necessario, chiarificazione ovvero filtrazione prima dell'imbottigliamento.	Avanzato: FCM con kit FISH (rilevamento più rapido e specifico rispetto alla coltura classica – cfr. capitolo 3.2)	OIV Code – Brettanomyces (node 3239); AWRI Brett detection; AGROTUR+: cfr. D.2.1.1, capitolo 9.6
La concentrazione di 4-etilguaiacolo supera il limite inferiore della soglia sensoriale (100–160 µg/L)	Confermare la presenza di *B. bruxellensis* con un metodo microbiologico adeguato (FCM, qPCR o coltura). Se la presenza di B. bruxellensis non è confermata, verificare anche la possibilità di un contributo di altri microrganismi alteranti e adeguare il contenuto di SO_2 libero, e monitorare la stabilità microbiologica fino all'imbottigliamento.	Minimo: analisi cromatografica dei fenoli volatili	Yang et al., 2021 (soglia 4-EG); AGROTUR+: cfr. D.2.1.1, capitolo 9.6

4.5 KT5 – Controllo preliminare prima della valutazione ufficiale e dell'imbottigliamento

Se (condizione / segnale di allarme)	Allora (misura)	Metodo consigliato	Fonte/standard

Deviazione dei parametri chimici dalla specifica DOP Teran (acido lattico < 1 g/l, acidità volatile > 1,0 g/l, valutazione organolettica < 16,5 punti)	Eseguire un'analisi microbiologica classica con coltura come metodo di riferimento per confermare la stabilità microbiologica prima dell'imbottigliamento.	Minimo: controllo chimico e sensoriale interno	Regolamento DOP Teran artt. 12, 15
Il controllo microbiologico finale confermi la presenza di microrganismi vivi	La coltura classica come standard di riferimento per la conferma definitiva della stabilità microbiologica prima dell'imbottigliamento	Minimo/di riferimento: coltura su terreni selettivi (OIV-MA-AS4-01)	OIV Compendium, sect. 4 (OIV-MA-AS4-01); AWRI Wine Microorganism Culture Collection

5. Tabella sintetica delle soglie di rischio

La tabella seguente riunisce i valori di riferimento chiave utilizzati nelle matrici decisionali del capitolo 4. La tabella comprende i requisiti normativi, le raccomandazioni tecniche e le soglie sensoriali della letteratura internazionale e, dove pertinente, li integra con i risultati del monitoraggio microbiologico condotto nell'ambito del progetto AGROTUR+.[20]

Tabella 2: Valori di riferimento per il controllo microbiologico del vino DOP Teran.

Parametro	Valore di riferimento / requisito	Fonte	Risultati AGROTUR+ (cfr. D.2.1.1)
Acido lattico	≥ 1 g/L	Regolamento DOP Teran art. 12	1,00–1,77 g/L (2024); la conformità è migliorata dall'86,4% (2023) al 100% (2024)
Acidità volatile	≤ 1,0 g/L	Regolamento DOP Teran art. 12	0,28–1,02 g/L; 1 campione su 48 (2,1%) ha superato il valore limite
Residuo di acido malico (indicatore di FML completata)	< 0,1–0,2 g/L (vicino al limite di determinazione del metodo)	Valore di riferimento analitico	0–3,21 g/L (2023) e 0–0,16 g/L (2024); quattro campioni dell'annata 2023 non avevano completato la FML.
SO_2 durante la FML	al di sotto di circa 30 mg/L generalmente favorevole; sopra circa 40 mg/L può essere inibitorio; sopra 50–60 mg/L marcatamente inibitorio	AWRI MLF guidelines	SO_2 totale: 19–58 mg/L.

[20] Yang, J. et al. (2021). Sensory thresholds of volatile phenols (4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol) in wine.

Istamina	2–10 mg/L (raccomandazioni nazionali orientative di alcuni Stati membri UE; nell'UE non esiste un valore limite legale unico per il vino)	OIV – Code of good vitivinicultural practices, biogenic amines (node 3311); raccomandazioni nazionali degli Stati membri UE	Intervallo 2,02–35,66 mg/L; concentrazione media 21,86 mg/L. In una parte dei campioni analizzati le concentrazioni erano superiori alle raccomandazioni nazionali orientative.
4-etilguaiacolo (4-EG)	100–160 µg/L (soglia sensoriale pubblicata)	Yang et al., 2021	4/48 campioni (8,3%) sopra il limite inferiore della soglia
4-etilfenolo (4-EP)	440–620 µg/L (soglia sensoriale pubblicata)	Yang et al., 2021	0–134,0 µg/L – tutti i campioni sotto la soglia

6. Frequenza di campionamento consigliata e tempistica del controllo avanzato

Tabella 3: Tempistica consigliata per il campionamento e il controllo microbiologico avanzato per punto di controllo.

Punto di controllo	Monitoraggio minimo	Controllo avanzato (quando indicato, cfr. capitolo 2.2)
KT1 – Ricevimento dell'uva e del mosto	Ad ogni ricevimento (esame visivo dello stato sanitario)	FCM del mosto in caso di sospetto di aumento della carica microbica o di aumento del rischio di alterazione microbiologica
KT2 – Fermentazione alcolica	Monitoraggio giornaliero della densità ovvero del contenuto di zucchero	FCM, se necessario, in caso di fermentazione rallentata, riduzione della viabilità dei lieviti o sospetto di presenza di microrganismi potenzialmente alteranti.
KT3 – FML	Monitoraggio settimanale dell'acido malico e lattico	FCM ovvero analisi del microbioma (sequenziamento del gene 16S rRNA) in caso di FML ritardata o non riuscita (ad es. senza la prevista diminuzione dell'acido malico dopo 3–4 settimane); qPCR in caso di sospetto di aumento del rischio di formazione di ammine biogene.
KT4 – Maturazione/stoccaggio prima dell'imbottigliamento	Monitoraggio periodico di SO_2 e controllo sensoriale del vino	FCM (con FISH per *B. bruxellensis*) e/o analisi cromatografica dei fenoli volatili in caso di sospetto di alterazione microbiologica ovvero

		prima di una maturazione prolungata o dell'imbottigliamento.
KT5 – Prima dell'imbottigliamento	Controllo chimico e sensoriale interno obbligatorio prima della presentazione del vino alla valutazione ufficiale	Metodi di coltura classici (coltura su terreni selettivi) per confermare la stabilità microbiologica del vino prima dell'imbottigliamento.

7. Passaggio a D.2.1.3 – trasferimento delle linee guida sulla piattaforma winecider.net

Le matrici decisionali del capitolo 4 e la tabella sintetica dei valori di riferimento (capitolo 5) costituiscono la base tecnica per la preparazione delle istruzioni adattate all'utente nell'ambito del risultato D.2.1.3. I contenuti saranno presentati sulla piattaforma *winecider.net* sotto forma di liste di controllo chiare organizzate per le singole fasi della produzione del vino (ricevimento dell'uva, fermentazione alcolica, fermentazione malolattica, maturazione del vino e verifica di conformità prima dell'imbottigliamento), tabelle dei parametri analitici chiave e dei valori di riferimento, nonché raccomandazioni per l'attuazione del monitoraggio microbiologico di base e avanzato. Particolare attenzione sarà dedicata all'applicazione pratica delle raccomandazioni OIV, delle linee guida tecniche AWRI e dei requisiti del Regolamento sul vino con denominazione tradizionale riconosciuta Teran nel lavoro quotidiano dei produttori.

Nell'ambito di D.2.1.3 le linee guida saranno preparate come contenuto digitale statico e stampabile, integrato da una raccolta di fonti specialistiche e materiali formativi per i produttori.

Oltre alla piattaforma *winecider.net* le linee guida e i risultati chiave saranno accessibili, in conformità con il piano di disseminazione del progetto AGROTUR+, anche tramite la piattaforma *e-karst.eu*, il che contribuirà a una loro più ampia accessibilità tra i produttori e il pubblico specialistico dell'area del Carso.[21]

8. Conclusioni

Le linee guida di questo documento collegano il monitoraggio di base, necessario per garantire la conformità ai requisiti del Regolamento sul vino con denominazione tradizionale riconosciuta Teran, con metodi analitici avanzati (citometria a flusso, qPCR e analisi del microbioma mediante sequenziamento del gene 16S rRNA), utilizzati nell'ambito del progetto AGROTUR+ per il monitoraggio della qualità microbiologica dei vini DOP Teran. I metodi scelti consentono un rilevamento più rapido ovvero una definizione più dettagliata dei rischi microbiologici rispetto ai metodi di coltura classici, in particolare nel monitoraggio della fermentazione malolattica, nella valutazione del rischio di formazione di ammine biogene e nel rilevamento della presenza di Brettanomyces bruxellensis. Le matrici decisionali per punto di controllo (capitolo 4) e la tabella sintetica dei valori di riferimento

[21] AGROTUR+ – Teran Academy and Karst products (notizia con i risultati del progetto). https://www.ita-slo.eu/en/news-and-events/news/teran-academy-and-karst-products

(capitolo 5) costituiscono il nucleo operativo del documento e la base tecnica per la preparazione delle istruzioni adattate all'utente nell'ambito del risultato D.2.1.3 per la piattaforma winecider.net.

Le presenti linee guida non sostituiscono la legislazione vigente, ma costituiscono uno strumento tecnico di supporto che aiuta i produttori e il personale di cantina a pianificare e realizzare il monitoraggio microbiologico e, se necessario, a integrare in modo appropriato le analisi di base con metodi microbiologici avanzati per l'individuazione precoce e la gestione dei rischi microbiologici.