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.