



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**CONTROL MICROBIOLÒGIC EN BODEGA. INCIDENCIA
DE *BRETTANOMYCES***

**Universitat Politècnica de València.
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del
Medio Natural
Master Universitario de Gestión de la Seguridad y Calidad
Alimentaria**

LUIS SALVADOR TERRADES ROCAFULL

TUTORES

**MANUEL HERNÁNDEZ PÉREZ ^a
JORGE CAUS PERTEGAZ ^b**

^a Profesor Titular de Microbiología, del departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València

^b Ingeniero Agrónomo. Director Técnico de la Cooperativa Vinícola La Viña (D.O. Valencia)

Resumen

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta una bodega, es referido a la calidad de los vinos. Uno de los parámetros de más difícil control, es el microbiológico. El más temido, es la contaminación por levaduras del género *Brettanomyces*, pues pueden producir muy rápidamente un deterioro acusado de la calidad del vino. Debido a los métodos de procesado y embotellado, una contaminación mínima puede rápidamente extenderse por todos los depósitos del complejo, llegando a afectar de forma crónica a los caldos de la bodega, con el subsiguiente perjuicio económico. En una bodega de tamaño medio, el continuo control que se realiza al vino, hacen posible una vigilancia del mismo en todas las etapas, tratando de identificar aquellos parámetros que pueden ser coincidentes en el aumento/disminución de las colonias de *Brettanomyces*, y con ello realizar un nuevo protocolo de elaboración del vino.

Abstract

One of the main problems facing a winery, is based on the quality of the wines. One of the more difficult parameters to control is the microbiological. The most feared, is contamination by *Brettanomyces* yeasts, they can produce a sharp deterioration in the quality of wine very quickly. Because the methods of processing and bottling, minimal contamination can quickly spread all deposits of the complex, affecting chronically the wines of the winery, with subsequent economic loss. In a medium-sized cellar, continuous monitoring that is done to wine, make possible supervise it at all stages, trying to identify those parameters that can be matched in the increase / decrease of *Brettanomyces* colonies, and thereby make a new protocol winemaking.

Resum

Un dels principals problemes als quals s'enfronta un celler, és referit a la qualitat dels vins. Un dels paràmetres de més difícil control, és el microbiològic. El més temut, és la contaminació per llevats del gènere *Brettanomyces*, doncs poden produir molt ràpidament un deteriorament acusat de la qualitat del vi. A causa dels mètodes de processament i embotellat, una contaminació mínima pot ràpidament estendre's per tots els dipòsits del complex, arribant a afectar de manera crònica, als vins del celler, amb el subsegüent perjudici econòmic. En un celler de mida mitjana, el continu control que es realitza al vi, fan possible un control del mateix en totes les etapes, tractant d'identificar aquells paràmetres que poden ser coincidents en l'augment / disminució de les colònies de *Brettanomyces*, i amb això realitzar un nou protocol d'elaboració del vi.

Palabras clave: *Brettanomyces bruxellensis*, *Dekkera*, vino, bodega, sulfuroso, protocolo calidad

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Brettanomyces/Dekkera*, son potencialmente perjudiciales para una gran cantidad de alimentos líquidos pero su incidencia adquiere importancia para el vino, especialmente durante el añejado en barricas, pues puede dar lugar a una reducción de la calidad del vino resultante. Se trata de un problema al cual, el mundo del vino ha tratado de poner solución, pero la misma es harto difícil, no sólo por las particularidades del género, sino con unos kits que requieren de un entrenamiento previo para su percepción, la única forma de detección efectiva, es el análisis por medio de cultivo diferencial.

El vino es el producto de interacciones complejas entre levaduras y bacterias en el mosto de uva. El origen de estos microorganismos y la vía por la cual llegan hasta el mosto es una cuestión debatida desde hace tiempo, pero en la actualidad se admite que las levaduras y bacterias que participan en las fermentaciones tienen dos posibles orígenes: la uva y el material de la bodega (Fleet y Heard, 1993; Mortimer y Polsinelli, 1999). Dentro del grupo de las levaduras, cabe distinguir dos grupos, entre las *no-Saccharomyces*, que colonizan la parte externa de los granos de uva, conjuntamente con otros microorganismos; Y el conjunto de *Saccharomyces sp.*, que son los principales agentes de la fermentación alcohólica, (V. Renouf et al., 2006). Una vez realizada la fermentación alcohólica, entran en acción las bacterias que cursan la fermentación maloláctica. La carga microbiana de la uva que entra en la bodega está formada casi exclusivamente por levaduras *no-Saccharomyces*, por lo que la inoculación de los mostos con *Saccharomyces* se produce principalmente a través del material de la bodega (I.S. Pretorius, 2000). Las bacterias lácticas están presentes durante todas las etapas de vinificación, y al igual que las levaduras, entran con la uva y permanecen en el equipamiento de las bodegas tras la fermentación maloláctica.

Las primeras fermentaciones espontáneas, tanto alcohólicas como malolácticas, que tienen lugar en las bodegas cada campaña, suelen ser más largas que las que tienen lugar a continuación. La razón podría estar en el aumento de microorganismos que se produce en el primer depósito, y en su posterior diseminación por la bodega, por lo que llegarían en gran cantidad a los depósitos posteriores.

Los estudios realizados hasta la fecha, se centran fundamentalmente, en un control de las condiciones del laboratorio, para valorar la producción de los compuestos volátiles que le confieren al vino, su *carácter Brett*, (4-etilfenol, 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol, fundamentalmente), (S. Benito et al., 2009) y gracias a ello, han salido al mercado kits de laboratorio que permiten a un catador entrenado, no sólo percibir la contaminación por *Brettanomyces*, sino también, la concentración aproximada de la población de levaduras en el vino, (Sniff' Brett©). La gran mayoría de estos estudios

realizados sobre el género *Brettanomyces* (o *Dekkera*, según autores puede ser usado indistintamente), ha sido realizado en condiciones controladas de laboratorio. Pocos de los trabajos, han sido realizados *in situ*. Quizás debido a la dificultad de control de condiciones en una bodega al uso

En este trabajo, tratamos de identificar los depósitos contaminados por *Brettanomyces*, una vez el mosto ha realizado la fermentación maloláctica, y está en condiciones de pasar a depósitos de estabilización y/o barricas, siguiendo la bibliografía editada, (S. Benito et al., 2009) y comprobar si alguna de las características físico-químicas del vino, conjuntamente con la adición de conservantes autorizados por la legislación vigente, impide el desarrollo de *Brettanomyces* en los depósitos, con el objetivo de asegurar la calidad del vino procesado en la bodega.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

- Envases estériles para toma de muestras
- Mechero Bunsen
- Campana de flujo laminar
- Placas Petri de 50 mm de diámetro, con soporte de siembra de Millipore®
- Filtros de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro, de Millipore®
- Medio Wallerstein de Millipore®, para cultivo de bacterias y levaduras en bebidas alcohólicas. En ampollas de plástico de 2 ml. Composición (g/l): Digerido pancreático de caseína: 5.0 g.; Extracto de levadura: 4.0 g.; Dextrosa: 50.0 g.; Fosfato monopotásico: 0.55 g.; Cloruro potásico: 425.0 mg.; Cloruro cálcico: 125.0 mg.; Sulfato magnésico: 125.0 mg.; Cloruro férrico: 2.5 mg.; Sulfato de Manganeso: 2.5 mg.; Verde de bromocresol: 22.0 mg.
- Medio selectivo para el crecimiento de *Brettanomyces* de Millipore®. En ampollas de plástico de 2ml. Composición (g/l): Extracto de malta: 3.0 g.; Extracto de levadura: 3,0 g.; Peptona: 5,0 g.; Dextrosa: 10.0 g.; Chloramphenicol (D.C.I.): 0.1 g.; Thiamine (D.C.I.): 0.01 g.; Cycloheximide (D.C.I.): 0.1 g.; Gentamycin (D.C.I.): 0.05 g.; Chlortetracycline (D.C.I.): 0.1 g.
- Rampa de filtrado de Millipore®
- Pinzas
- Estufa
- Tira API 32C ® para la identificación de Levaduras
- Espectrómetro de Infrarrojo Winescan®, de FOSS, para la identificación de parámetros en líquidos.
- pHmetro micro pH 2000, de Crison®

- Oxímetro de sonda polarográfica para vino HI 9146V, de HANNA®
- Destilador automático para % alcohol DE2000, de TDI®
- Valorador de SO₂ libre y total ENO20 PLUS, de TDI®
- Bureta
- Vasos de precipitados
- Probeta 1 l.
- NaOH 5N
- H₂SO₄ 6,04M
- I₂ en solución 0,02N

2.2. Método

Antecedentes: Metodología de producción y embotellado en la bodega.

Una vez realizada y verificada la fermentación maloláctica en los tanques de fermentación, y el vino se encuentra “terminado”, conforme a los criterios del Director Técnico, y la Enóloga, el vino puede o no ser mezclado con otros vinos procedentes de otros depósitos para conseguir el resultado deseado. Una vez realizado (o no), este paso, es trasvasado, previo filtrado por diatomeas, a los depósitos de frío, donde permanece un mínimo de 8 días, antes de pasar a los depósitos de estabilización, con otro filtrado por diatomeas intermedio. En estos depósitos es donde se realiza la adición de SO₂, hasta conseguir niveles de efectividad, y no sobrepasar los fijados por la ley, (actualmente, 150 mg/l para tintos, y 200 mg/l para rosados y blancos). De aquí, una vez realizada y verificada la adición de SO₂, se pasa a embotellado, previo paso por filtros consecutivos con un tamaño de poro de 3, 1 y 0.45 µm, para asegurar, tanto la no inclusión de partículas y posos en el vino, como el control microbiológico del mismo, y evitar fermentaciones en botella. Caso de no terminar el depósito de estabilización en el embotellado del lote, si por motivos de producción no va a ser usado ese vino en breve lapso, puede que el tanque de estabilización necesite ser usado para otro vino, por lo que puede ser trasvasado a un tanque exterior, con el cambio en las condiciones que representa, y quedar a la espera de ser usado en un *coupage*, o en un pedido posterior del mismo tipo de vino. También puede ocurrir que se encuentren varios depósitos de estabilización con el mismo vino. Los *huecos* (sic), se reúnen y pasan a un sólo tanque, quedando a la espera de una orden de producción.

Se establece un protocolo de toma de muestras por los distintos depósitos de la bodega, que en conjunto, conforman un total de 186 depósitos, aparte de los experimentales y las barricas. **(Anexo I)**.

Debido a las características de producción de la bodega, se realiza un primer muestreo, con el fin de establecer una muestra significativa, para valorar el porcentaje de depósitos afectados.

En una segunda etapa, se traza hacia atrás el producto embotellado diariamente, con el fin de tomar muestras del depósito de estabilización del cual se está embotellando, y éste a su vez, de que depósito(s) de fermentación procede(n). Debido a las órdenes de producción, y a los

tiempos que toma la estabilización, en ocasiones no ha sido posible llegar hasta el depósito de fermentación.

Una vez recogidas las muestras, en el laboratorio de la bodega, y en la campana de siembra, se filtran las muestras procesadas, y se siembran en medios de cultivo selectivo de *Brettanomyces*. Se incuban, atendiendo a las instrucciones del fabricante, durante 5 días en estufa a 28°C, y se contabilizan, caso que las hubiere, las colonias. Si en este primer recuento, el resultado es negativo, se incuban 48 horas más, y se vuelve a hacer un recuento. Si el resultado en un primer momento hubiese sido positivo, se observa la variación en la población de las colonias. Para nuestro trabajo, tomaremos en consideración las colonias finales al cabo de los 7 días, para descartar falsos negativos. Además, y según el protocolo de la bodega, se realiza un cultivo en medio Wallerstein de cada uno de los lotes embotellados diariamente.

Al mismo tiempo que se hace la siembra, se realiza el análisis del vino por espectrometría infrarroja, para tomar nota de las características físico-químicas del mismo, (Materias reductoras, acidez volátil y total, pH, grado alcohólico, ácido málico, ácido láctico), de las cuales sólo tendremos en consideración para este trabajo las materias reductoras, pH, y grado alcohólico, en atención a la bibliografía previa. El pH se confirma con un pHmetro, y el grado alcohólico con una destilación de 1 l. de vino, y posterior medida con un densímetro. La medida del densímetro, a la temperatura del laboratorio en ese momento, se trasladará a 20°C, con ayuda de las tablas.

El anhídrido sulfuroso total se mide en mg/l. y para ello se realiza una valoración yodométrica, añadiendo a una alícuota de 20 ml de vino, 2 ml de NaOH 5N, tapando con film y esperar 5 minutos. Los azúcares presentes en el vino se combinan con el anhídrido sulfuroso. (**fig.1**). El objetivo de añadir NaOH, es el de desplazar el equilibrio, pues es muy reversible, para liberar el SO₂. La capacidad de combinación del SO₂ con los azúcares, es muy pequeña. Por ejemplo, 1 gramo de glucosa combina con sólo 0.3 mg de SO₂ cada 50 mg/l de SO₂ libre. Toda adición de anhídrido sulfuroso al vino, tendrá como consecuencia la combinación de una parte de éste. Inversamente, toda desaparición de anhídrido sulfuroso libre por oxidación, tendrá como consecuencia una disminución de la fracción combinada. Se añaden transcurridos los 5 minutos 2 ml de ácido sulfúrico 6,04 M, para desplazar el anhídrido según el equilibrio (**fig.2**). Se realiza la valoración con lodo 0,02 N.

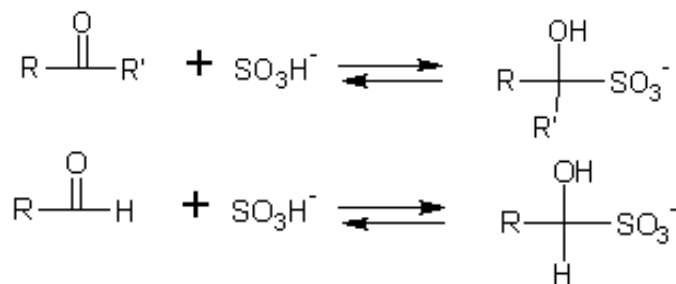


Fig. 1: Combinación del anhídrido sulfuroso con azúcares

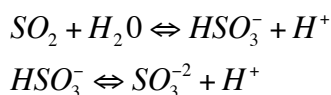


Fig. 2: Ecuación de equilibrio del anhídrido sulfuroso

El oxígeno disuelto se mide *in situ*, con el oxímetro, de la misma muestra que se ha hecho el cultivo, una vez completado el mismo.

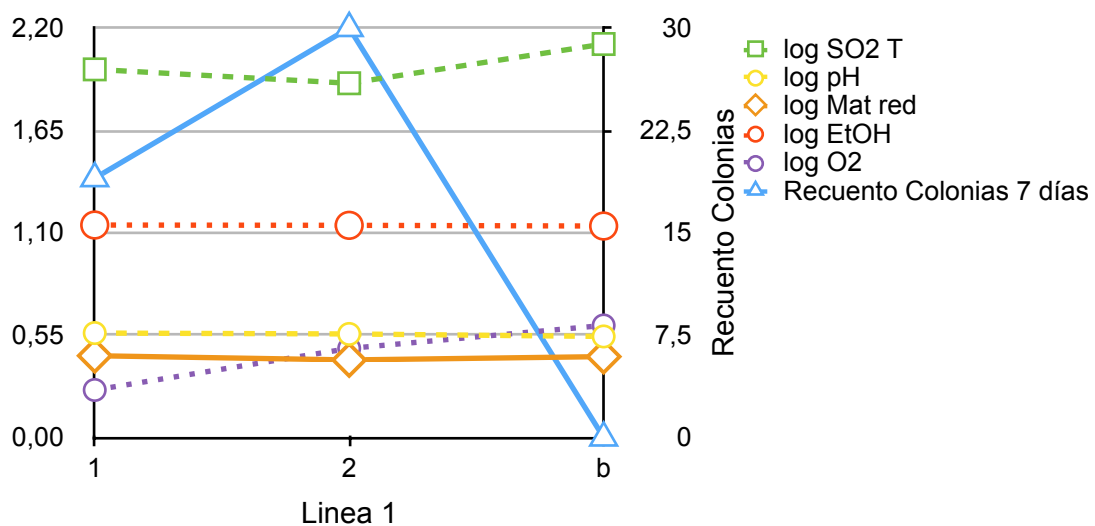
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

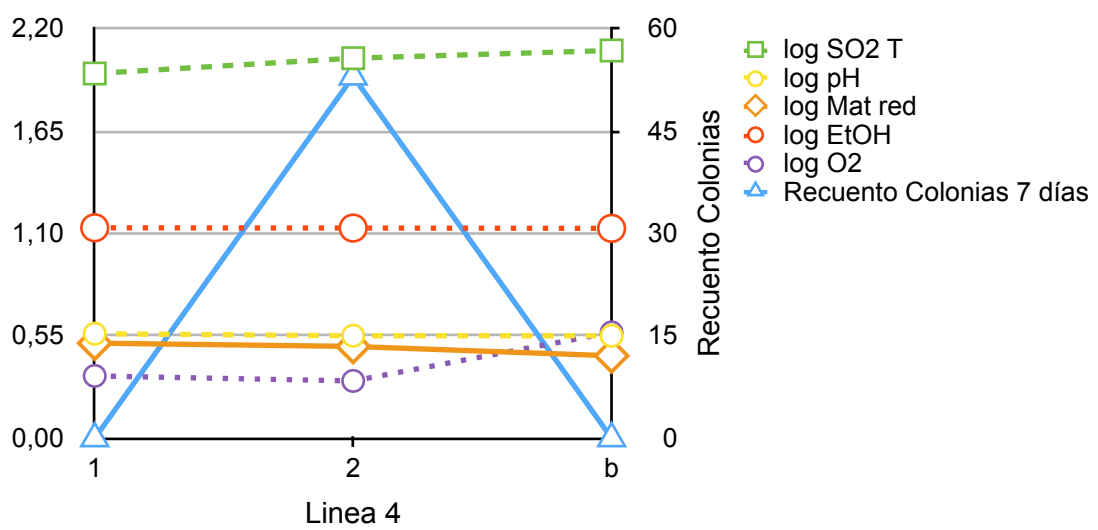
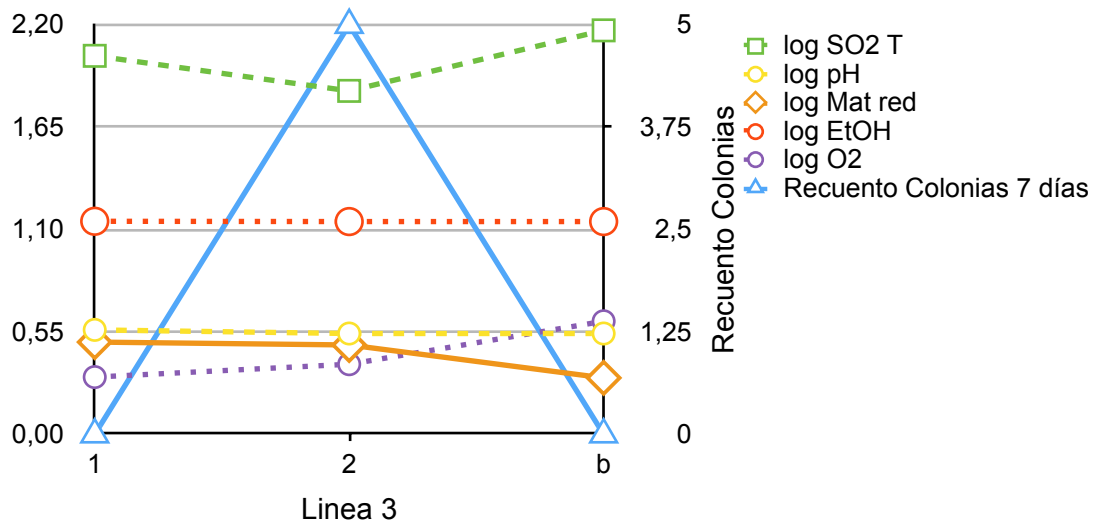
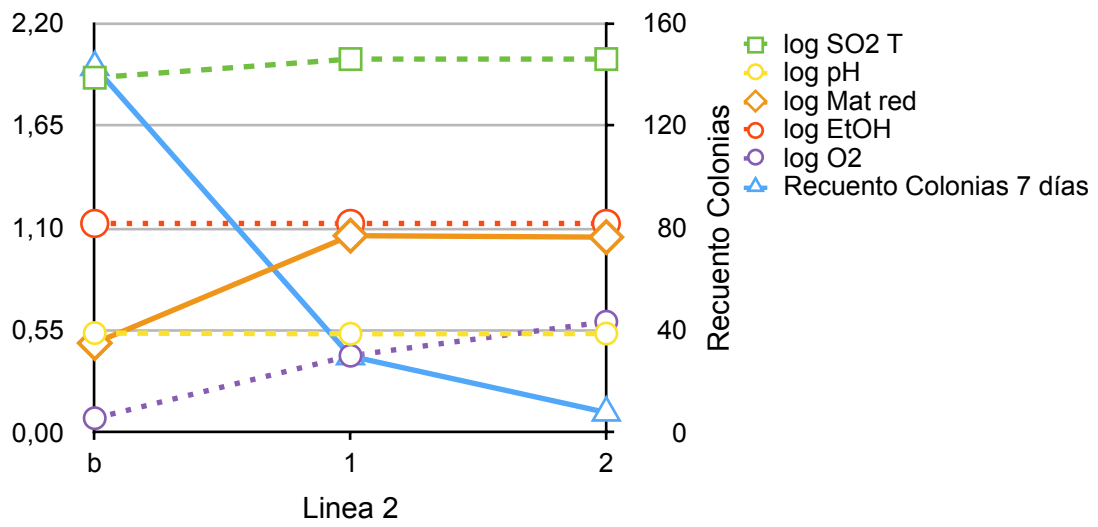
El total de registros trazados correctamente que dieron algún resultado positivo al análisis por *Brettanomyces*, en algún punto de la trazabilidad, se encuentra representado en la **tabla 1**, (con la excepción del vino blanco, pues es el único depósito presente en la bodega en el momento del trabajo, y era conveniente hacer un estudio sobre él). Los resultados se expresan en la **figura 3**, donde se representa en escala logarítmica los valores obtenidos, frente al número de colonias de *Brettanomyces* observadas en los depósitos. La tabla con todos los resultados obtenidos de todos los depósitos analizados, se encuentra en el **anexo II**.

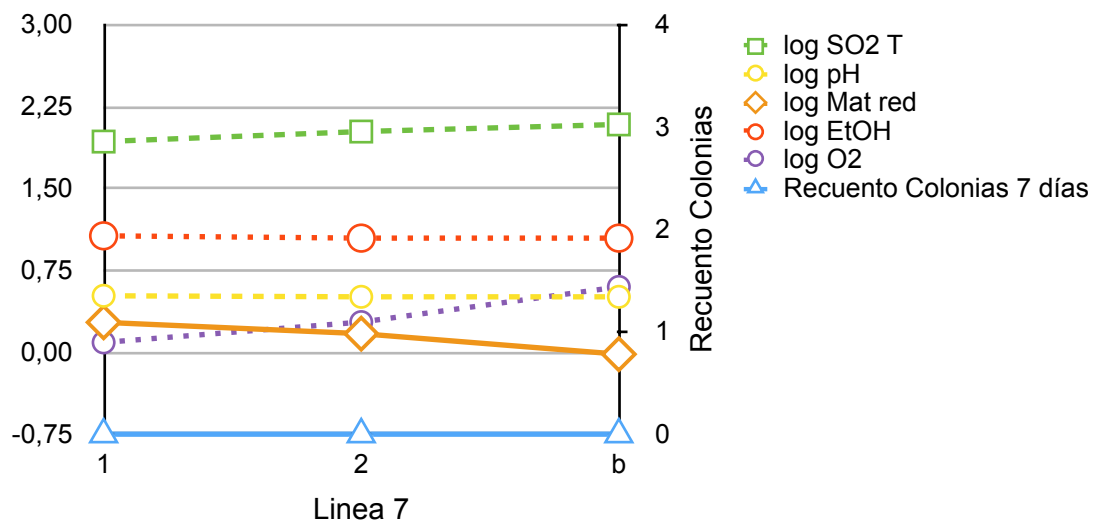
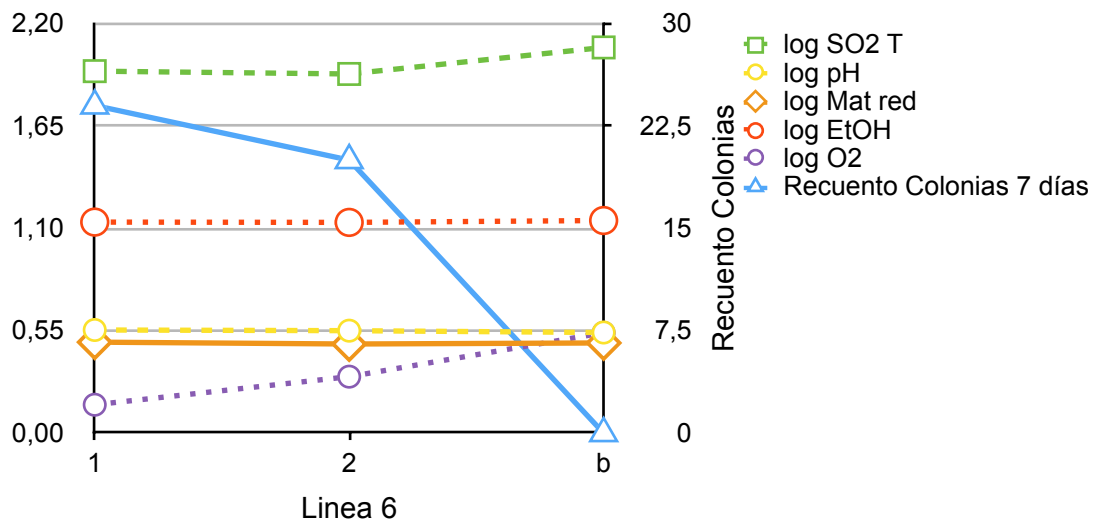
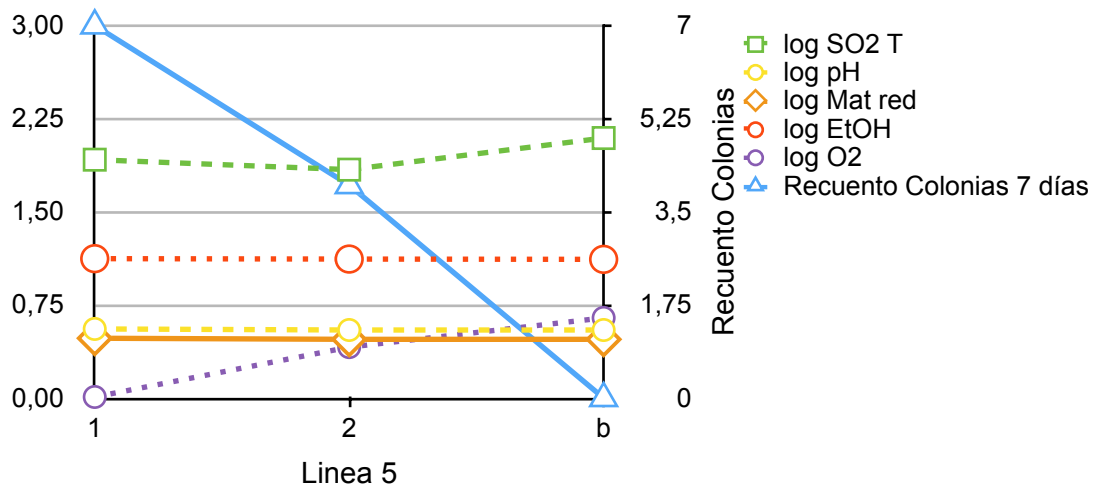
Tabla 1: Resultados obtenidos del cultivo selectivo de *Brettanomyces* a 7 días. En aras de la protección de datos de la bodega, se han sustituido la identificación de los depósitos. Cada línea trazada, ha recibido una numeración, y dentro de cada línea, el *depósito 1* se refiere al de fermentación. El *depósito 2*, al de estabilización. La *b* hace referencia al vino embotellado. Todas las líneas se refieren a vinos tintos, excepto la línea 7 (vino blanco), y la línea 8, (vino rosado).

Línea	Depósito	Recuento Colonias 7 días	SO Total (mg/l)	pH	Mat. Reductoras (g/l)	EtOH (v/v)	O (ppm)
Línea 1	1	19	95,00	3,64	2,75	13,85	1,80
	2	30	80,00	3,60	2,61	13,80	3,01
	b	0	130	3,49	2,72	13,68	4,00
Línea 2	1	143	81,00	3,44	3,04	13,35	1,20
	2	30	102,00	3,41	11,48	13,35	2,60
	b	8	102,00	3,42	11,27	13,35	3,96
Línea 3	1	0	108,00	3,64	3,13	13,95	2,03
	2	5	70,00	3,48	3,02	13,90	2,38
	b	0	148,00	3,48	2,01	13,90	4,05
	1	0	91,00	3,64	3,24	13,50	2,16

Línea	Depósito	Recuento Colonias 7 días	SO Total (mg/l)	pH	Mat. Reductoras (g/l)	EtOH (v/v)	O (ppm)
Línea 4	2	53	110,00	3,55	3,11	13,45	2,03
	b	0	121,00	3,55	2,77	13,40	3,70
Línea 5	1	7	83,00	3,60	3,03	13,25	1,02
	2	4	69,00	3,53	2,97	13,15	2,57
	b	0	124,00	3,53	2,97	13,08	4,42
Línea 6	1	24	88,00	3,58	3,08	13,60	1,42
	2	20	85,00	3,55	3,01	13,55	2,01
	b	0	118,00	3,47	3,05	13,87	3,46
Línea 7	1	0	85,00	3,29	1,88	11,65	1,23
	2	0	105,00	3,22	1,48	11,10	1,89
	b	0	122,00	3,22	0,96	11,10	3,97
Línea 8	1	7	77,00	3,46	2,74	13,80	1,28
	2	0	120	3,10	5,95	12,00	3,84
	b	0	153	3,60	11,00	13,10	4,00
Línea 9	1	9	89,00	3,67	3,19	13,60	1,52
	2	27	116,00	3,42	6,37	13,35	2,90
	b	0	120,00	3,39	6,00	13,30	3,46
Línea 10	1	0	75,00	3,62	2,70	13,90	2,02
	2	167	83,00	3,46	3,45	14,00	4,46
	b	0	105,00	3,45	2,93	13,20	4,32







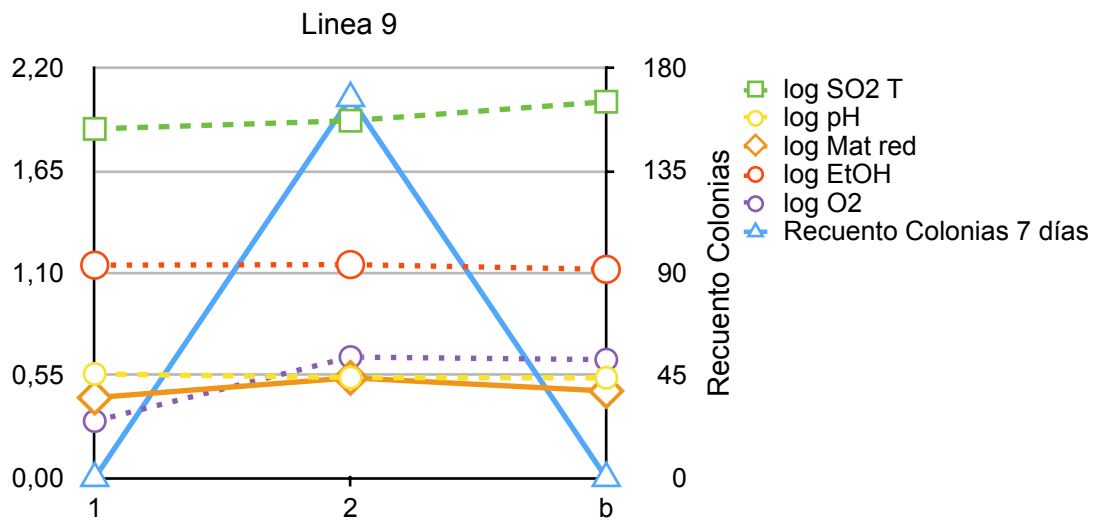
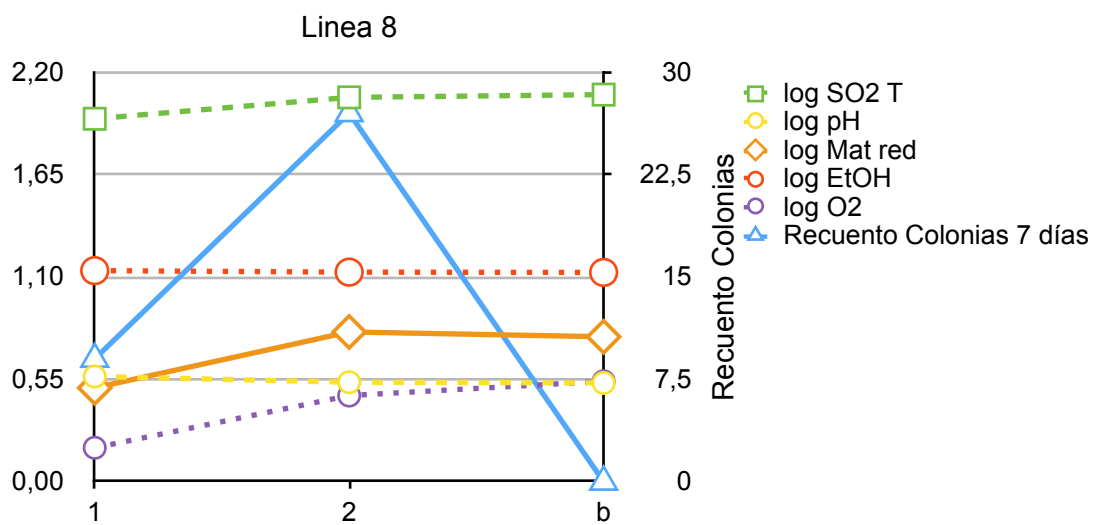
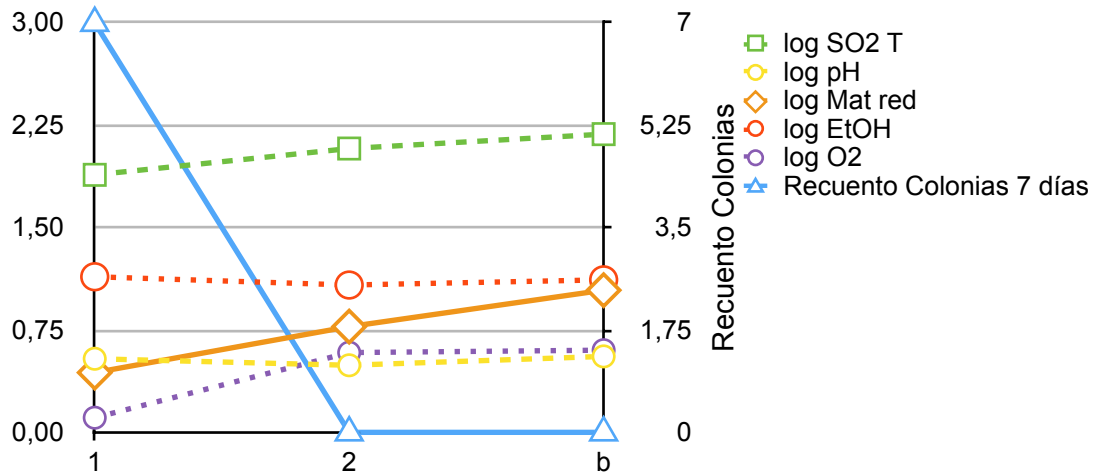


Fig.3. Recuento de colonias en medio diferencial de *Brettanomyces*, (triángulo), frente a (escala logarítmica), concentración de SO₂ (cuadrado), pH (círculo amarillo, línea rayas), materias reductoras (rombo), grado EtOH (triángulo invertido) y O₂ disuelto (círculo morado, línea puntos).

Concentrándonos únicamente en los vinos tintos, pues tanto el blanco, (línea 7), como el rosado (línea 8), no presentan sustrato suficiente para el crecimiento de *Brettanomyces*, como se puede comprobar en el número de u.f.c. respectivo, se puede apreciar que:

- Con la excepción de un caso, (con anomalías registradas en el embotellado: por orden expresa del cliente, no se estabilizó el vino, pues debía ser facturado en 24 hrs. así que se añadió SO₂ y se embotelló directamente), a las botellas no llega contaminación por *Brettanomyces* ni por levaduras y/o bacterias lácticas que crezcan en medio Wallerstein®

- Eliminando los referidos al blanco y rosado, en un 50% de los casos, existe mas contaminación en los depósitos de estabilización que en los de fermentación. Esto puede ser debido a:

- a. Mala praxis en la limpieza

- b. Relleno de huecos procedente de diversos depósitos, alguno de ellos contaminado

- c. La no adición de SO₂, en cantidad suficiente en el depósito de adiciones, para garantizar su acción bacteriostática

- El contenido en O₂ disuelto va aumentando conforme el vino pasa por los distintos depósitos, siendo siempre superior en la botella que en los depósitos. Esto es debido a los fenómenos de aireación que se producen en los trasvases y en el proceso del embotellado.

- No aparenta que ningún parámetro afecte de forma única al aumento/disminución del número de colonias. Ni siquiera la adición de SO₂, pues en todos los casos nos encontramos por encima del nivel referido por la bibliografía como bacteriostático. (S. Benito et al., 2009). La referida sinergia de los distintos factores químicos, debería bastar para garantizar un no crecimiento bacteriano y/o de levaduras.

4. CONCLUSIONES

- a. No se puede establecer con rigurosidad, en un espacio de tiempo de cuatro meses, la interferencia de parámetros químicos por sí mismos, con la inhibición del crecimiento de *Brettanomyces* en los depósitos de la bodega. Son necesarios estudios más minuciosos, con identificación de las colonias positivas en medio diferencial por PCR.

- b. Existe un parámetro no químico que es común, y que es determinante en la desaparición de las levaduras. En el vino embotellado no hay casos de contaminación de ningún tipo ya sea por *Brettanomyces*, ni por cualquier bacteria láctica y/o levadura, que crecen en medio Wallerstein®. En todos los casos, y debido al control microbiológico de la bodega, en el período del trabajo, los test microbiológicos sobre producto terminado, dieron como resultado crecimiento nulo. Esto es debido a los filtros físicos de 3 µm, 1 µm y 0.45µm, puestos en serie antes de la embotelladora, y al protocolo de limpieza de la embotelladora.

- c. La estabilización por frío durante 8 días en tanques isotermos, debe de influir en el proceso, (S. Benito et al., 2009), reduciendo la carga

microbiológica del vino e inactivando una gran cantidad de la misma. Sin embargo una vez estabilizado, resulta paradójico que al menos el 50% de los tanques de estabilización con vino tinto, tengan más carga que los de fermentación de los que proceden. Esto es un indicador de una contaminación persistente en los tanques. Ya sea porque los tanques aún no han sido vitrificados y la limpieza no es exhaustiva. O porque al no haber flora competitiva, pues ha sido afectada por la estabilización en frío, sólo se depende de la adición de SO₂ para evitar la proliferación de *Brettanomyces*.

- d. Las condiciones en laboratorio, distan mucho de ser las condiciones de trabajo en bodega, por lo que representa mayor dificultad en el control de *Brettanomyces*.

Una vez tomadas estas consideraciones y puestas en conocimiento del Director Técnico, se elabora un posible plan de actuación que consiste en:

1. Actualmente, se está vitrificando la totalidad de los depósitos de estabilización, lo que conllevará una mayor facilidad en su limpieza y desinfección con sosa.
2. Se debe de prestar una mayor atención a la limpieza de los depósitos, realizando controles exhaustivos que verifiquen la misma, tal y como se hacen en otros puntos de la línea de producción. Esto implica un cambio en el protocolo de limpieza y desinfección. Las barricas deben de considerarse como un depósito más. Hay que incluirlas en la verificación de desinfección.
3. Una vez establecidas de forma rutinaria las verificaciones, se puede disminuir la carga microbiológica que llega a los depósitos, con un filtrado mecánico una vez el vino ha terminado la fermentación maloláctica, como paso previo a su estabilización. Esta filtración no afecta a las cualidades organolépticas del vino, pues no influirá más que en el contenido de posos y carga microbiológica.
4. Como se aprecia en el embotellado de la línea 2, el filtrado por si mismo no garantiza que no lleguen levaduras a botella/barricas. Puede deberse a que el filtro se colmate, o que el SO₂ no ha tenido tiempo suficiente para actuar. La sinergia de todos los factores químicos ha sido estudiada por otros autores (S. Benito et al., 2009), y se aplica ampliamente en bodegas. Se debería comprobar la sinergia del filtrado previo con los factores químicos.
5. Este paso previo, y verificada su efectividad a medio plazo, puede dar lugar a la posibilidad de una disminución del contenido de SO₂ en el vino, pues su objetivo quedaría en parte cubierto por la filtración previa. Esto conlleva a la elaboración de vinos de más calidad y que conlleven menos peligros para la población de riesgo, asmáticos en particular, principal diana toxicológica del SO₂, (Vally H. y Misso N.LA., 2012).

5. AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido posible gracias al apoyo de la Cooperativa Vinícola La Viña, durante mi estancia en prácticas en la bodega, y la tutela de su Director Técnico, D. Jorge Caus Pertegaz

6. REFERENCIAS

- Agnolucci M., Rea F., Sbrana C., Cristani C., Fracassetti D., Tirelli A., Nuti M. 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*. **143**: 76-80
- Aguilar M.G., Délia M.L., Strehaiano P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **61**: 157-162
- Benito S., Palomero F., Morata A., Calderón F., Suárez-Lepe J.A. 2009. A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* **106**: 1743-1751
- Benito S., Palomero F., Morata A., Calderón F., Suárez-Lepe J.A. 2009. Factors Affecting the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase Activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* Control in Red Wine Making. *Journal of Food Science*. **74(1)**: 15-22
- Coulon J., Perello M.C., Lonvaud-Funel A., deRevel G., Renouf V. 2010. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *Journal of Applied Microbiology*. **108**: 1450-1458
- Dias, L., Dias S., Sancho T., Stender H., Querol A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*. **20**: 567-574
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, pp. 27–54.
- Harris V., Ford C.M., Jiranek V., Grbin P.R. 2008. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **78**: 997-1006
- Mortimer, R. Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*. **150(3)**: 199-204
- Ortega-Heras M., González-Huerta C., Herrera P., González-Sanjosé M.L. 2004. Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Analytica Chimica Acta*. **513**: 341-350
- Pretorius I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. **16**: 675-729
- Renouf V., Falcou M., Miot-Sertier C., Perello M.C., De Revel G., Lonvaud-Funel A. 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*. **100**: 1208-1219
- Roman A., Perello M.C., de Revel G., Lonvaud-Funel A. 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*. **104**: 1577-1585
- Romano A., Perello M.C., de Revel G., Lonvaud-Funel A. 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*. **104**: 1577-1585
- Serpaggi V., Fabienne R., Recorbert G., Gaudot-Dumas E., Sequira-Le Grand A., Alexandre H. 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*. **30**: 438-447
- Suárez R., Suárez-Lepe J.A., Morata A., Calderón F. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*. **102**: 10-21
- Vally H, Misso NLA. 2012. Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*; **5(1)**: 16-23

7. ANEXOS

I. Protocolo de detección de *Brettanomyces* en bodega

Se elimina toda referencia a planos de la bodega y material sensible:

1. Objetivo

El presente protocolo tiene como objeto establecer la toma de muestras y la detección temprana de *Brettanomyces*.

2. Alcance

Se analizarán todos los depósitos presentes en la empresa, así como un muestreo proporcional en barricas

3. Metodología

Según plano de emplazamiento de depósitos de la bodega, se trata de hacer un muestreo diario de los depósitos, subdividiendo por zonas la bodega. Cada día previa reunión con enólogo y director de producción, se anotarán los depósitos que contengan producto susceptible de ser analizado. Los vinos sulfitados, se debe esperar 10-15 días hasta el análisis.

Depósitos Exteriores: (Registro 1):

- Lunes: Cuadrante superior izquierda, comprendido entre los depósitos *xa* y *xb*.
- Martes: Cuadrante superior derecha, comprendido entre los depósitos *xc* y *xd*, excluido el *aa*
- Miércoles: Cuadrante inferior izquierda, comprendido entre los depósitos *xe* y *xf*.
- Jueves: Cuadrante inferior derecha, comprendido entre los depósitos *xg* y *xí*.

Depósitos interiores: (Registro 2)

- Viernes: Todos los depósitos desde el *ay* al *az*.

Barricas

Al menos una vez cada *x* días, se realizará también en barricas. Previa consulta con enólogo y director técnico, se determinará, atendiendo al tipo de vino y barrica.

Atendiendo al kit utilizado, se realizará una metodología u otra:

3.1. Protocolo DOLMAR Sniff' Brett:

3.1.1. En Depósito:

Material:

- Bote análisis estéril,
- Mechero Bunsen,
- Sniff' Brett,
- Estufa a 30°C

Toma de muestra de vino del depósito:

- A ser posible, y aunque no lo contemple el procedimiento oficial, pasar la llama por la boca de toma de muestras.
- Realizar la toma de la parte inferior del depósito
- Descartar 50 ml.
- Tomar 20 ml de vino en recipiente estéril bajo llama.
- Inocular los 20 ml de muestra en recipiente Sniff' Brett, bajo llama.
- Cerrar envase bajo llama.
- Incubar a 30°C en estufa

Análisis de resultados:

- Cada día, se observará la evolución, cumplimentándose la ficha de control (Registro 3)
- Observar y anotar turbidez en zona inferior del envase. (Indicador positivo previo de crecimiento, generalmente 24-48 horas antes de aparecer el olor)
- Abrir el envase y detectar presencia de olor característico, (cuero, caballo, tinta...)
- La analítica finaliza al detectar el olor, (positivo a *Brettanomyces*), o, si transcurridos 10 días del comienzo del análisis no aparece, (negativo a *Brettanomyces*)

3.1.2. En Barrica:

Material:

- Bote de análisis estéril
- Mechero Bunsen
- Sniff' Brett
- Virutas
- Alcohol 70%
- Estufa a 30°C.

Toma de muestra de vino de la barrica:

- A ser posible, y aunque no lo contemple el procedimiento oficial, pasar la llama por la boca de toma de muestras. Si no es posible pasar la llama, se trabajará bajo llama.
- Descartar 50 ml.
- Tomar 20 ml de vino en recipiente estéril bajo llama.
- Inocular los 20 ml de muestra en recipiente Sniff' Brett, bajo llama.
- Añadir 2-3 gramos de virutas de madera, bajo llama
- Añadir 0.5 ml de Alcohol 70%, bajo llama.
- Cerrar envase bajo llama.
- Incubar a 30°C en estufa

3.1.3. Análisis de resultados:

- Cada día, se observará la evolución, cumplimentándose la ficha de control (Registro 3)
- Observar y anotar turbidez en zona inferior del envase. (Indicador positivo previo de crecimiento, generalmente 24-48 horas antes de aparecer el olor)

- Abrir el envase y detectar presencia de olor característico, (cuero, caballo, tinta...)
- La analítica finaliza al detectar el olor, (positivo a *Brettanomyces*), o, si transcurridos 16 días del comienzo del análisis no aparece, (negativo a *Brettanomyces*)
- En este caso, es posible que se necesiten más de 10 días para la aparición del olor. Se recomienda continuar hasta los 16 días

3.1.4. Alternativa para validar:

- Realizar la toma de la parte inferior del depósito/barrica.
- Pasar llama por boca de toma de muestra, si no se puede, trabajar bajo llama.
- Descartar los primeros 50 ml.
- Tomar muestra en envase estéril, bajo llama.
- Cerrar y cubrir
- Trasladar al laboratorio y continuar en campana y bajo llama.
- Tomar 20 ml de vino en recipiente estéril bajo llama.
- Inocular los 20 ml de muestra en recipiente Sniff' Brett, bajo llama.
- Si es toma de barrica, entonces añadir 2-3 gramos de virutas de madera y 0.5 ml de alcohol al 70%, bajo llama.
- Cerrar envase bajo llama.
- Incubar a 30°C en estufa

3.1.5. Interpretación de resultados:

DIAS NECESARIOS PARA POSITIVO	POBLACIÓN ESTIMADA	ACCIÓN
>10 días / No Aparece (16 días si se trata de barrica)	Ausencia en 20 ml	Repetir en 30 días
10 días (Si se trata de barrica, continuar hasta los 16 días)	Muy débil (\approx 1 lev/ml)	Repetir en 15 días
8 días	Débil (\approx 10 lev/ml)	Repetir en 7 días
6 días	Media (10)	Repetir inmediatamente Repetir tras 5 días
4 días	Significativo (10 lev/ml)	Método de tratamiento validado por enólogo/ Dir. Técnico.
2 días	Fuerte (10)	Repetir análisis al cabo de unos días. Si se sulfita, esperar 10-15 días.

3.2. Protocolo Merck-Millipore

Ya sea en depósito o barrica se procederá de la siguiente forma:

Material:

- Envase de análisis,
- mechero Bunsen, embudo de filtrado, filtro de 0.45 µm y 47 mm Ø, Placa Petri con soporte, medio de cultivo selectivo Millipore®.

Toma de muestra:

- Realizar la toma de la parte inferior del depósito/barrica.
- Pasar llama por boca de toma de muestra, si no se puede, trabajar bajo llama.
- Descartar los primeros 50 ml.
- Tomar muestra en envase estéril, bajo llama.
- Cerrar y cubrir
- Trasladar al laboratorio y continuar en campana y bajo llama.
- Filtrar muestra a vacío, usando filtro de 0.45 µm y 47 mm Ø. Bajo llama
- Inocular medio de cultivo específico *Brettanomyces* en el soporte de la placa Petri. Bajo llama
- Una vez filtrado el vino, depositar el filtro encima del soporte impregnado del medio de cultivo. Asegurarse que todo el filtro está en contacto con el soporte. Bajo llama.
- Cultivar a 28 °C, durante unos 5-7 días.
- Las colonias aparecen pequeñas, de color blanco y cremosas.

3.2.1. Análisis de Resultados:

- Se cumplimentará la ficha correspondiente, (Registro 4).
- La primera lectura se establece a los 5 días.
- Una segunda lectura a los 7 días, para descartar falsos negativos.

3.2.2. Interpretación de resultados

DIAS CULTIVO	POBLACIÓN ESTIMADA	ACCIÓN
5 días	Ausencia	Esperar 48 h
	Presencia	Comunicar Dir. Técnico
7 días	Ausencia	Descartar
	Presencia	Comunicar Dir. Técnico

4. Registros

4.1. Registro 1 Plano de Depósitos Exteriores

4.2. Registro 2 Plano de Depósitos Interiores

4.3. Registro 3 Ficha Control Sniff' Brett Depósitos

Identificación	Fecha	Día 5			Día 7		
		Fecha				Fecha	
Negativo				Negativo			
Positivo		Recuento:		Positivo	Recuento:		
Fecha				Fecha			
Negativo				Negativo			
Positivo		Recuento:		Positivo	Recuento:		
Fecha				Fecha			
Negativo				Negativo			
Positivo		Recuento:		Positivo	Recuento:		
Fecha				Fecha			
Negativo				Negativo			
Positivo		Recuento:		Positivo	Recuento:		
Fecha				Fecha			
Negativo				Negativo			
Positivo		Recuento:		Positivo	Recuento:		

4.4. Registro 4 Ficha Control Millipore

Identif.	Fecha	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
		Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
		T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:
		Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
		T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:
		Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
		T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:	T: O:

II. Tabla de datos de los depósitos

Los números de los depósitos se han alterado por confidencialidad

Identificación	Fecha	Día 5		Día 7		Fecha Análisis	Tª	SO	SO	pH	AcVcl	ActVcl	Int Reductor	Ac. Maltico	Ac. Láctico	EICH	O ₂	Notes
		Fecha	Reuento:	Fecha	Reuento:													
X01	29/04/14	Negativo	5/05/14	Negativo	7/05/14	29/04/14	19.5	29.00	80.00	3.72	0.53	5.61	3.06	0.19	1.38	13.60	1.50	
		Positivo	Reuento: 26	Positivo	Reuento: 62													
X02	29/04/14	Negativo	5/05/14	Negativo	7/05/14	29/04/14	20º	19.00	117.00	3.74	0.51	5.28	3.14	0.31	1.27	14.30	1.56	
		Positivo	Reuento:	Positivo	Reuento:													
X03	29/04/14	Negativo	5/05/14	Negativo	7/05/14	29/04/14	19.0	31.00	95.00	3.64	0.53	5.49	2.75	0.25	1.24	13.85	1.80	VaaiV08
		Positivo	Reuento: 19	Positivo	Reuento: 19													
X04	02/05/14	Negativo	7/05/14	Negativo	9/05/14	2/05/14	20.0	30.00	90.00	3.52	0.46	5.97	3.04	0.27	1.13	13.90	1.80	
		Positivo	Reuento:	Positivo	Reuento:													
X05	02/05/14	Negativo	7/05/14	Negativo	9/05/14	2/05/14	19.5	31.00	71.00	3.65	0.48	5.49	3.18	0.16	1.13	14.00	2.18	
		Positivo	Reuento: 37	Positivo	Reuento: 53													
X06	02/05/14	Negativo	7/05/14	Negativo	9/05/14	2/05/14	20.0	26.00	80.00	3.74	0.51	5.55	3.32	0.20	1.31	14.60	1.60	
		Positivo	Reuento: 4	Positivo	Reuento: 62													
X07	07/05/14	Negativo	12/05/14	Negativo	14/05/14	7/05/14	19.5	22.00	80.00	3.61	0.51	5.85	3.04	0.48	1.25	13.10	1.87	
		Positivo	Reuento: 70	Positivo	Reuento: 70													
X08	07/05/14	Negativo	12/05/14	Negativo	14/05/14	7/05/14	20.0	32.00	89.00	3.67	0.49	5.53	3.19	0.31	1.37	13.60	1.52	VAALY13
		Positivo	Reuento: 0	Positivo	Reuento: 9													
X09	07/05/14	Negativo	12/05/14	Negativo	14/05/14	7/05/14	21.0	29.00	75.00	3.82	0.49	5.12	2.91	0.21	1.43	14.10	1.24	
		Positivo	Reuento:	Positivo	Reuento:													
X10	09/05/14	Negativo	14/05/14	Negativo	16/05/14	9/05/14	20.5	24.00	68.00	3.61	0.53	6.14	3.05	0.45	1.20	12.60	1.19	
		Positivo	Reuento: 35	Positivo	Reuento: 35													
X11	09/05/14	Negativo	14/05/14	Negativo	16/05/14	9/05/14	20.0	25.00	64.00	3.65	0.53	6.06	3.06	0.51	1.20	13.10	1.56	
		Positivo	Reuento: 15	Positivo	Reuento: 15													
X12	09/05/14	Negativo	14/05/14	Negativo	16/05/14	9/05/14	22.0	30.00	74.00	3.54	0.42	5.88	2.21	0.54	1.12	13.30	2.58	
		Positivo	Reuento:	Positivo	Reuento:													
X13	23/05/14	Negativo	28/05/14	Negativo	30/05/2014	23/05/14	20.0	22.00	65.00	3.64	0.48	6.19	3.13	0.53	1.22	13.95	1.89	
		Positivo	Reuento: 62	Positivo	Reuento: 60													
X14	26/05/14	Negativo	30/05/2014	Negativo	2/06/14	26/05/14	21.5	29.00	88.00	3.59	0.51	5.56	3.36	0.24	1.41	13.60	3.23	VaaiV23
		Positivo	Reuento: 40	Positivo	Reuento: 65													
X15	04/06/14	Negativo	9/06/14	Negativo	11/06/14	4/06/14	24.0	23.00	78.00	3.66	0.51	5.73	3.05	0.41	1.28	13.10	1.18	
		Positivo	Reuento: 5	Positivo	Reuento: 15													
X16	04/06/14	Negativo	9/06/14	Negativo	11/06/14	4/06/14	24.0	26.00	81.00	3.44	0.48	5.96	3.04	0.30	1.12	13.35	1.20	SIN ISO va al Y"10. Se embotella y resio va al ISO.
		Positivo	Reuento: 50	Positivo	Reuento: 143													

X17	09/06/14	Fecha	14/06/14	Fecha	16/06/14	5/06/14	20.0	27.00	75.00	3.62	0.49	5.36	2.70	0.18	1.32	13.90	2.02	VAAL Y10
		Negativo	Reuento: 1	Negativo	Reuento: 1													
X18	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	18/06/14	22.0	21.00	85.00	3.29	0.33	6.88	1.88	2.50	0.28	11.65	1.23	Va al Y19
		Negativo	Reuento: 1	Negativo	Reuento: 1													
X19	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	23/06/14	21.0	26.00	83.00	3.60	0.48	5.73	3.03	0.60	0.97	13.25	1.02	Va al Y21
		Negativo	Reuento: 7	Negativo	Reuento: 7													
X20	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	12/06/14	22.0	28.00	77.00	3.46	0.44	6.04	2.74	0.32	1.36	13.80	1.28	VAAL Y18
		Negativo	Reuento: 23	Positivo	Reuento: 23													
X21	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	12/06/14	21.5	26.00	83.00	3.60	0.48	5.73	3.03	0.36	1.40	13.25	1.34	
		Negativo	Reuento: 5	Positivo	Reuento: 5													
X22	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	10/06/14	22.0	29.00	88.00	3.58	0.44	5.81	3.08	0.24	1.41	13.60	1.42	Va al Y23
		Negativo	Reuento: 24	Negativo	Reuento: 24													
X23	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	10/06/14	22.0	21.00	80.00	3.64	0.52	6.19	3.13	0.37	1.33	13.95	1.67	
		Negativo	Reuento: 56	Positivo	Reuento: 56													
X24	30/04/14	Fecha	5/05/14	Fecha	7/05/14	30/04/14	20º	25.00	52.00	3.49	0.33	7.85	1.95	0.52	1.29	13.30	2.20	
		Negativo	Reuento: 20	Positivo	Reuento: 64													
X25	30/04/14	Fecha	5/05/14	Fecha	7/05/14	30/04/14	20º	11.00	65.00	3.41	0.36	6.42	1.99	1.36	0.52	14.30	2.38	
		Negativo	Reuento: 1	Negativo	Reuento: 1													
X26	30/04/14	Fecha	5/05/14	Fecha	7/05/14	30/04/14	18.0	22.00	57.00	3.44	0.49	6.12	2.52	0.53	1.13	13.85	1.78	
		Negativo	Reuento: 4	Positivo	Reuento: 72													
X27	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	18.5	26.00	73.00	3.50	0.40	6.19	1.66	0.44	1.33	12.80	2.19	
		Negativo	Reuento: 60	Positivo	Reuento: 60													
X28	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	18.0	38.00	84.00	3.52	0.39	5.62	1.98	0.61	0.92	13.70	2.39	
		Negativo	Reuento: 1	Positivo	Reuento: 1													
X29	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	19.0	34.00	84.00	3.49	0.43	6.15	2.21	0.50	1.10	13.70	3.14	
		Negativo	Reuento: 58	Positivo	Reuento: 58													
X30	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	12/06/14	24.0	33.00	108.00	3.64	0.44	6.19	3.13	0.55	0.94	13.95	2.03	Se va al Y20
		Negativo	Reuento: 1	Negativo	Reuento: 1													
X31	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	5/06/14	24.0	34.00	91.00	3.64	0.48	5.73	3.24	0.52	1.29	13.50	2.16	
		Negativo	Reuento: 118	Negativo	Reuento: 118													

X31	10/07/14	Fecha	15/07/14	Fecha	17/07/14	5/08/14	24.0	34.00	91.00	3.64	0.48	5.73	3.24	0.52	1.29	13.50	2.16	Va al Y17
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y01	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	27/05/14	14.00	86.00	3.49	0.53	6.45	3.33	0.60	0.99	13.40	2.67	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y02	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	10.0	46.00	118.00	3.50	0.48	5.98	2.41	0.34	1.25	13.90	2.47	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y03	14/05/14	Fecha	19/05/14	Fecha	21/05/14	14/05/14	10.0	33.00	131.00	3.48	0.63	6.34	2.67	0.37	1.25	14.40	0.60	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y04	21/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	28/05/14	21/05/14	10.0	30.00	85.00	3.48	0.51	5.94	2.52	0.30	1.29	13.80	3.20	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y04	21/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	28/05/14	21/05/14	10.0	42.00	105.00	3.48	0.50	5.94	2.40	0.26	1.29	13.80	3.89	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y05	21/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	28/05/14	21/05/14	10.0	26.00	86.00	2.73	0.36	6.33	1.47	2.04	0.46	12.00	5.42	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y06	21/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	28/05/14	21/05/14	10.5	55.00	163.00	3.10	0.35	6.54	5.95	2.49	0.08	12.00	3.84	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y07	23/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	30/05/2014	23/05/14	10.0	28.00	78.00	3.49	0.48	5.36	2.36	0.30	1.29	13.80	2.40	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y07	23/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	30/05/2014	23/05/14	22.0	45.00	106.00	3.42	0.51	5.35	2.82	0.28	1.29	13.85	2.38	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y08	23/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	30/05/2014	23/05/14	11.0	21.00	80.00	3.60	0.51	5.36	2.61	0.44	1.07	13.80	3.01	Viene del X03
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y09	23/05/14	Fecha	28/05/14	Fecha	30/05/2014	16/05/14	10.5	22.00	85.00	3.67	0.55	5.51	3.01	0.44	1.12	13.85	2.55	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y10	28/05/14	Fecha	30/05/2014	Fecha	2/06/14	28/05/14	16.2	27.00	83.00	3.46	0.64	6.52	3.45	0.53	0.95	14.00	4.46	VIENE DEL X17
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y10	04/06/14	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/06/14	15.0	35.00	102.00	3.41	0.51	5.96	11.48	0.30	1.12	13.35	2.60	Viene del X16.
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y11	09/06/14	Fecha	14/06/14	Fecha	16/06/14	5/06/14	10.0	26.00	74.00	3.56	0.44	5.51	3.03	0.25	1.33	13.85	2.96	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y12	12/06/14	Fecha	16/06/14	Fecha	18/06/14	12/06/14	5.5	23.00	89.00	3.57	0.51	4.98	3.15	0.35	1.24	13.30	2.78	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													
Y12	12/06/14	Fecha	16/06/14	Fecha	18/06/14	12/06/14	5.5	23.00	89.00	3.57	0.51	4.98	3.15	0.35	1.24	13.30	2.78	
		Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>													

Y13	Fecha	16/06/14	Fecha	18/06/14	12/06/14	10.0	45.00	116.00	3.42	0.40	5.96	6.37	0.30	1.13	13.35	2.90	VIENE DEL X08
	Negativo		Negativo														
Y14 (ShiftBract+)	Fecha	4/07/14	Fecha	6/07/14	24/06/14	13.0	24.00	75.00	3.40	0.37	6.12	2.41	0.61	0.84	13.85	1.98	
	Reuento: 27		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y15	Fecha	4/07/14	Fecha	6/07/14	20/06/14	11.5	25.00	63.00	3.49	0.49	5.51	2.72	0.28	1.13	13.60	2.62	
	Reuento: 107		Reuento: 107														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y16	Fecha	4/07/14	Fecha	6/07/14	25/06/14	10.5	21.00	71.00	3.51	0.44	5.51	3.18	0.32	1.20	13.70	2.40	
	Reuento: 109		Reuento: 109														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y17	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	12/06/14	10.5	36.00	110.00	3.55	0.55	5.35	3.11	0.45	1.24	13.45	2.03	Viene del X31
	Reuento: 48		Reuento: 53														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y18 (RDS)	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	9/06/14	10.5	25.00	120.00	3.10	0.33	6.12	5.95	0.32	1.11	12.00	3.84	VIENE DEL X20
	Reuento: 4		Reuento: 5														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y19 (BLA)	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	1/07/14	11.0	35.00	105.00	3.22	0.22	6.36	1.48	0.32	1.10	11.10	1.89	VIENE DEL X18
	Reuento: 3		Reuento: 5														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y20	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	9/06/14	10.5	19.00	70.00	3.48	0.51	5.36	3.02	0.55	0.91	13.90	2.38	Viene del X30
	Reuento: 3		Reuento: 5														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y21	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	27/06/14	10.5	17.00	69.00	3.53	0.44	5.51	2.97	0.46	0.83	13.15	2.57	Viene del X19
	Reuento: 4		Reuento: 4														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y22	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	1/07/14	11.0	21.00	80.00	3.60	0.51	5.51	3.14	0.46	0.83	13.40	2.15	
	Reuento: 15		Reuento: 23														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
Y23	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	2/07/14	11.0	31.00	85.00	3.55	0.48	5.20	3.01	0.44	1.05	13.55	2.01	Viene del X22
	Reuento: 20		Reuento: 20														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
B-Y08	Fecha	28/05/14	Fecha	30/05/2014	23/05/14	28.0	47.00	130.00	3.49	0.29	5.69	2.72	0.42	1.12	13.68	4.00	
	Reuento: 0		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
B-Y15	Fecha	9/06/14	Fecha	11/06/14	4/06/14	15.0	27.00	85.00	3.73	0.51	5.81	2.88	0.43	1.38	13.10	4.68	
	Reuento: 0		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
B-Y15	Fecha	9/06/14	Fecha	11/06/14	4/06/14	22.0	23.00	69.00	3.68	0.50	5.23	9.34	0.43	1.38	13.95	3.70	
	Reuento: 0		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
B-Y07	Fecha	9/06/14	Fecha	11/06/14	4/06/14	20.0	25.00	79.00	3.81	0.40	5.41	3.46	0.17	1.43	13.55	4.10	
	Reuento: 0		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														
B-Y10	Fecha	14/06/14	Fecha	16/06/14	30/05/14	14.5	39.00	105.00	3.45	0.52	5.78	2.93	0.30	1.12	13.20	4.32	
	Reuento: 0		Reuento: 0														
	Negativo		Negativo														
	Positivo		Positivo														

B-Y11	Fecha	14/06/14	Fecha	16/06/14	13/06/14	23.0	44.00	104.00	3.41	0.52	5.77	3.44	0.22	1.31	13.85	3.02	Viene del Y"10. Sin estabilizar
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	23.0	44.00	104.00	3.41	0.52	5.77	3.44	0.22	1.31	13.85	3.02	
B-Y"10	Fecha	14/06/14	Fecha	16/06/14	6/05/14	23.0	35.00	102.00	3.42	0.51	6.32	11.27	0.30	1.12	13.35	3.96	Viene del Y"10. Sin estabilizar
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento: 8	23.0	35.00	102.00	3.42	0.51	6.32	11.27	0.30	1.12	13.35	3.96	
B-Y13	Fecha	16/06/14	Fecha	18/06/14	13/06/14	23.5	41.00	120.00	3.99	0.52	6.81	6.00	0.87	1.12	13.30	3.46	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	23.5	41.00	120.00	3.99	0.52	6.81	6.00	0.87	1.12	13.30	3.46	
Botella de Deposito Vacio	Fecha	4/07/14	Fecha	6/07/14	18/06/14	26.0	52.00	120.00	3.60	0.50	5.36	11.00	0.32	1.15	13.10	4.00	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	26.0	52.00	120.00	3.60	0.50	5.36	11.00	0.32	1.15	13.10	4.00	
B-Y17	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	2/07/14	25.0	48.00	121.00	3.55	0.51	5.32	2.77	0.32	1.01	13.40	3.70	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	25.0	48.00	121.00	3.55	0.51	5.32	2.77	0.32	1.01	13.40	3.70	
B-Y18	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/07/14	25.0	50.00	153.00	3.60	0.23	6.08	11.00	0.32	1.11	13.10	4.00	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	25.0	50.00	153.00	3.60	0.23	6.08	11.00	0.32	1.11	13.10	4.00	
B-Y19	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/07/14	25.5	48.00	122.00	3.22	0.20	6.36	0.96	0.31	1.79	11.10	3.97	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	25.5	48.00	122.00	3.22	0.20	6.36	0.96	0.31	1.79	11.10	3.97	
B-Y20	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/07/14	25.0	56.00	148.00	3.48	0.41	5.20	2.01	0.55	0.91	13.90	4.05	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	25.0	56.00	148.00	3.48	0.41	5.20	2.01	0.55	0.91	13.90	4.05	
B-Y21	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/07/14	25.0	50.00	124.00	3.53	0.43	5.23	2.97	0.46	0.83	13.08	4.42	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	25.0	50.00	124.00	3.53	0.43	5.23	2.97	0.46	0.83	13.08	4.42	
B-Y22	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	4/07/14	26.5	40.00	127.00	3.53	0.44	4.84	2.14	0.46	0.83	13.27	3.99	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	26.5	40.00	127.00	3.53	0.44	4.84	2.14	0.46	0.83	13.27	3.99	
B-Y23	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	3/07/14	26.0	46.00	118.00	3.47	0.44	4.88	3.05	0.44	1.05	13.87	3.46	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento:	26.0	46.00	118.00	3.47	0.44	4.88	3.05	0.44	1.05	13.87	3.46	
B-Y"10 (Wall)	Fecha	9/07/14	Fecha	11/07/14	20/06/14	26.5	20.00	70.00	3.43	0.48	5.20	10.91	0.40	1.20	13.45	4.88	
	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Negativo	<input checked="" type="checkbox"/>	Reuento: 31	26.5	20.00	70.00	3.43	0.48	5.20	10.91	0.40	1.20	13.45	4.88	