

 **SCOTT SIMONIN, BENOÎT BACH**, CHANGINS, HAUTE ÉCOLE DE VITICULTURE ET ŒNOLOGIE, NYON
 **LISA MÜLLER, MAËLYS PUYO, VANESSA DAVID-VAIZANT, RAPHAËLLE TOURDOT-MARÉCHAL**,
 INSTITUT UNIVERSITAIRE DE LA VIGNE ET DU VIN JULES GUYOT, 21000 DIJON (FRANCE)
 **DOMINIQUE PINSUN**, AEB FRANCE, 68240 SIGOLSHEIM (FRANCE)
 **JEAN-VICTOR THOMANN**, CELLIER DU MUHLBACH, 68126 BENNWIHR (FRANCE)
 **ARNAUD IMMÉLÉ**, VINEDIA, 68150 OSTHEIM (FRANCE)



AUDIT MICROBIOLOGIQUE, UN RÉEL OUTIL D'INVESTIGATION EN ŒNOLOGIE ?



Divers endroits critiques pour la contamination microbienne. Montage photo : Changins – Haute Ecole de viticulture et Œnologie, S. Simonin.

1. INTRODUCTION

L'audit microbiologique est un processus largement développé dans le monde agroalimentaire. Son objectif est de mieux connaître le monde microbien et les risques associés afin de potentiellement identifier les différentes sources de contamination et de mettre en place des mesures préventives et correctives (Rogers *et al.* 1991). En œnologie, ce concept est très peu développé par les professionnels de la filière. Et pourtant, le réchauffement climatique modifie les écosystèmes microbiens et les paramètres physico-chimiques des baies de raisin. Dans les différents vignobles, une augmentation du pH est constatée lors la libération des jus de raisin laissant place à un développement d'une plus forte population de microorganismes (Bokulich *et al.* 2014; Liu *et al.* 2017). En parallèle, les réglementations de plus en plus drastiques limitant l'ajout de pesticides et de produits chimiques, incitent la profession à changer ses habitudes (Salaha *et al.* 2008; Simonin *et al.* 2018; Simonin *et al.* 2020). Le contexte socio-culturel de réduction des intrants chimiques dans les aliments est largement plébiscité par les consommateurs et les politiques (Vignolo *et al.* 2012) en témoignent les votations de juin 2021 en Suisse discutant du possible arrêt des pesticides. La maîtrise de la flore microbienne va donc devenir

un atout majeur au vu de ces changements afin de limiter les contaminations microbiennes.

Pendant deux années consécutives (millésimes 2018 et 2019), une cave coopérative que nous nommerons «cave G» a rencontré des problèmes de contamination microbienne sur plusieurs cépages : Sylvaner, Riesling et Gewürztraminer. Les symptômes observés pour chacune des matrices sont un arrêt de fermentation alcoolique (FA) suivi d'une fermentation malolactique (FML) avec une augmentation de la concentration d'acide lactique et de l'acidité volatile. Ces symptômes sont caractéristiques d'une piqûre lactique réalisée par les bactéries lactiques. En 2019, le volume de vins contaminés de Gewürztraminer représentait 15% du volume total de la cave, ce qui a entraîné de nombreuses répercussions, notamment une commercialisation impossible des vins et un surcoût de production non négligeable. De ce fait, l'œnologue de la cave a souhaité remédier à ce véritable problème. Pour cela, un audit microbiologique a été mis en place lors de la campagne de vinification 2020.

2. MATÉRIELS & MÉTHODES

Dans le but de répondre à la problématique de contamination microbienne rencontrée à la cave, différents points à risques ont été déterminés dans

l'itinéraire de vinification et un suivi régulier des populations microbiennes a été réalisé pendant la campagne de vinification (Fig. 1). Par rapport au diagnostic et aux différentes observations des symptômes des années antérieures, des milieux de culture microbiologique spécifiques ont été choisis :

- Milieu LAC : Spécifique des bactéries lactiques
- Milieu Mannitol : Spécifique des bactéries acétiques
- Milieu WL : Spécifique aux levures avec possibilité de différencier genre et espèce par la couleur des colonies
- Milieu ITV : Spécifique des levures *Brettanomyces* et *Hanseniaspora uvarum* (Gerbaux *et al.* 2009)

Des mesures d'ATP-Métrie ont également été effectuées afin de compléter les analyses microbiologiques (<300 RLU : surface propre; 300-600 RLU : critique; >600 : sale).

Des examens microscopiques ont été réalisés sur un vin contaminé de 2019 et sur les matrices de 2020. Le but était d'orienter l'identification bactérienne en différenciant les coques (genres *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*) des bacilles (*Lactobacillus*) par l'arrangement des cellules en paires, chaînettes ou tétrades (Bartowsky et Henschke 2008; Ribéreau-Gayon *et al.* 2000). Des dosages du D et L-lactate ont aussi été effectués afin d'affiner l'identification par voie métabolique.

3. RÉSULTATS-DISCUSSIONS

a. Etat sanitaire de la cave pendant la campagne 2020

- Après le nettoyage de la cuverie et avant le lancement de la vendange 2020 :

Les mesures d'ATP aux 10 points critiques de contamination potentiels (Tab. 1 en annexe) ont montré des surfaces relativement propres (<300 RLU) excepté pour le tuyau 2. Le nettoyage effectué au préalable semblerait efficace. Le niveau des populations bactériennes et levuriennes était relativement peu élevé (<10³ UFC/mL).

- Réception des premiers raisins et jusqu'à la fin de la vendange :

Les seuils de population en bactéries lactiques, bactéries acétiques et levures ont augmenté de façon exponentielle avec des niveaux très élevés (10⁶-10⁷ UFC/mL) (Fig. 2, 3 et 4 en annexe). Aucune *Brettanomyces* n'a été détectée. Les endroits de contamination critique se trouvaient dès la réception des raisins aux niveaux de la bande de transport, de la sortie des maies du pressoir alors qu'au niveau de la cuverie (entrée pompe de flottation, réactivateur levurien et vanne de la cuve de réhydratation), les niveaux de population étaient moins élevés numériquement. L'accessibilité au nettoyage était plus compliquée dans la partie vendangeoir comparé à la partie cuverie ce qui pourrait expliquer en partie ces données. La conception d'un vendangeoir plus facilement modulable aurait facilité le nettoyage. La procédure de nettoyage ne



DUPENLOUP SA

FABRIQUE DE POMPES
MAISON FONDÉE EN 1888



1219 Le Lignon (GE) 022 796 77 66 contact@dupenloup.ch

Pompes Smile, raccords, armatures de cuves et accessoires inox



OENO PÔLE

Au service de la qualité

1183 Bursins 078 716 40 00 info@oeno-pole.ch

Et bien plus sur: www.oeno-pole.ch

semblerait pas non plus suffisante au vu de l'ensemble de ces résultats d'où l'intérêt de mettre en place une procédure plus drastique : soude et acide peracétique. Des itinéraires techniques de vinification pourraient aussi aider à lutter contre le fort développement de ces populations microbiennes. Un grand nombre de levures et de bactéries indigènes ont pu se développer au sein de toute la cave lors de ces vendanges avec potentiellement des flores d'altérations. Pour donner suite à ces observations et aux années précédentes, nous avons donc regardé les flores bactériennes en présence.

b. Identification bactérienne

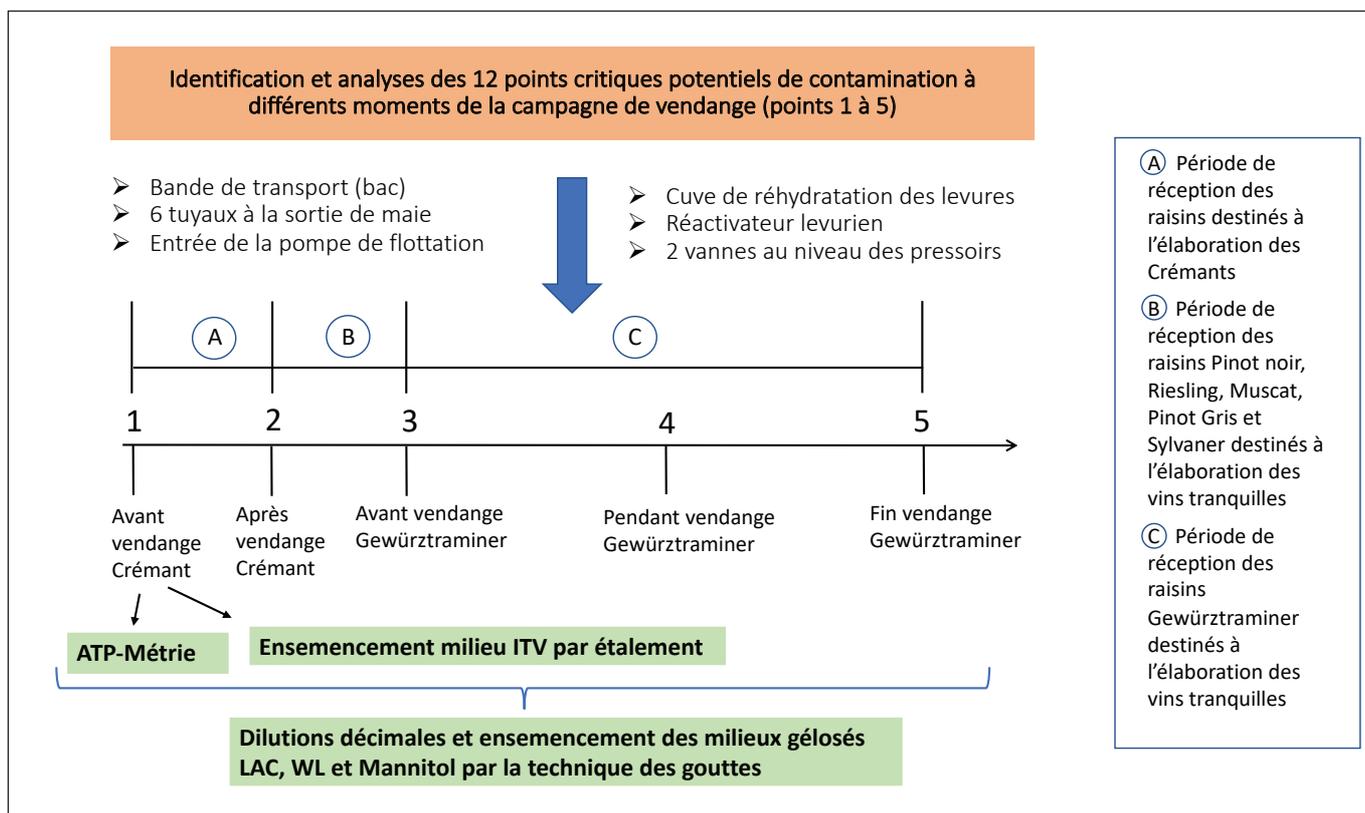
Identifier la ou les bactérie(s) responsables des piqûres lactiques est un autre aspect qui a été également abordé durant cet audit microbiologique. Un vin de Gewürztraminer 2020 a présenté des symptômes d'une piqûre lactique fulgurante avec une montée rapide d'acidité volatile et a pu être analysé avec le vin piqué de 2019.

La nature stéréochimique L ou D de l'acide lactique peut permettre d'orienter les espèces bactériennes responsables de ce phénomène (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000). En effet, les sucres sont transformés exclusivement en D-lactique par les coques *O. oeni* et *Leuconostoc* ou en D et L-lactique par les lactobacilles ou pédiocoques (Tab. 2 en annexe). Les levures, quant-à-elles, produisent peu d'acide D-lactique.

Pour le vin de Gewürztraminer 2020, un excédent de L-lactique a été constaté avec une valeur supé-

rieure à 0,3 g/L ce qui induirait la présence du genre *Pediococcus* et/ou *Lactobacillus*. Cette hypothèse est affirmée par la différence de la concentration en sucre entre la valeur finale attendue (25 g/L) et la valeur finale obtenue (12 g/L). De plus, une montée en acidité volatile a été relatée avec 0,82 g/L d' H_2SO_4 . Cette constatation montre l'intervention d'une bactérie hétérofermentaire : *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Les lactobacilles hétérofermentaires ont la capacité de réaliser la fermentation malolactique mais aussi de former de l'acide acétique et un mélange de D- et L-lactate (Bartowsky et Henschke 2008; Krieger-Weber *et al.* 2020). Pour le vin de 2019, les mêmes constats ont pu être faits avec une teneur élevée en L-lactate (3,4 g/L), en D-lactate (4,5 g/L) et en acidité volatile (1,3 g/L d' H_2SO_4) (Tab. 2 en annexe). Grâce à ces observations, nous avons pu émettre l'hypothèse qu'une bactérie hétérofermentaire appartenant au genre *Lactobacillus* soit intervenue. Des observations microscopiques ont été réalisées pour confirmer cette hypothèse et ont mis en évidence la présence, en très grand nombre, de coques en tétrades ou par paires dans le vin de 2019 et de 2020 (Fig. 5, 6). Cette morphologie cellulaire et cet arrangement sont caractéristiques du genre *Pediococcus*. Cependant, ce genre bactérien métabolise les sucres par la voie homofermentaire (Lonvaud-Funel 1999) et il est donc dans l'incapacité de former de l'acide acétique, ce qui est contradictoire avec la teneur dosée dans les matrices. Nous avons pu affirmer que le genre *Pediococcus*, observé au microscope, n'a pas pu être responsable de la

Fig. 1: Schéma du protocole mis en place pour évaluer l'état sanitaire.



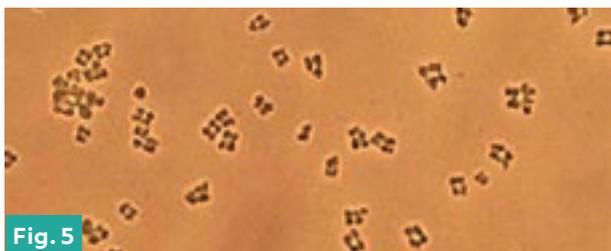


Fig. 5

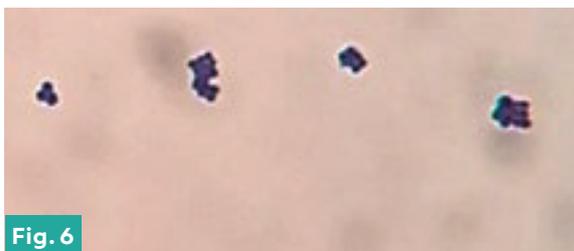


Fig. 6

Fig.5: Photo d'un état frais observé au microscope optique (x40) du vin 2020. Fig. 6: Photo d'une coloration de Gram au microscope optique (x1000 à immersion) du vin 2020.

piqûre lactique. L'ensemble des résultats nous a permis d'avancer l'hypothèse d'une co-contamination en bactéries lactiques c'est-à-dire une contamination par une bactérie appartenant au genre *Pediococcus* pour expliquer la formation en grande quantité de l'acide L-lactate et d'une autre bactérie hétérofermentaire d'altération appartenant au genre *Oenococcus*, *Leuconostoc* ou *Lactobacillus* pour expliquer l'augmentation de l'acidité volatile. Nous avons supposé que la bactérie hétérofermentaire n'a pu être observée au microscope car le niveau de population en pédiococoques était trop élevé. Ces données nous ont confirmé que la procédure d'hygiène était insuffisante et qu'un éventuel changement des itinéraires techniques de vinification aurait pu aider à inhiber la prolifération de ces bactéries lactiques.

4. CONCLUSION

La gestion des équilibres microbiens va être un concept majeur lors de ces prochaines années de vinification avec comme facteurs principaux, le changement climatique et les réglementations de plus en plus drastique. Dans la « cave G », une perte de la maîtrise microbiologique a expliqué les piqûres lactiques rencontrés depuis les vendanges 2018 avec une co-contamination bactérienne en 2019 et 2020. L'accès au vendangeoir est contraignant. Un développement non négligeable de microorganismes a été constaté pendant tout le processus de vinification avec des bactéries lactiques provoquant des arrêts de fermentations et des montées d'acidité volatile. La procédure de nettoyage n'était pas suffisante, de la soude couplée avec de l'acide peracétique pourrait être envisagée pour cette structure. Des protocoles de vinification pourraient aussi être mis en place :

- La récolte de nuit permettrait de diminuer les populations de microorganismes initiales
- La limitation de la phase d'attente entre la récolte et le pressurage empêcherait le fort développement des microorganismes sur baies de raisin (surtout en période estivale)
- L'utilisation de la bio-protection par des levures non-*Saccharomyces* ou/et par des bactéries *Oenococcus oeni*, ce qui permettrait d'obtenir une balance positive aux niveaux des flores d'intérêts œnologiques (Simonin *et al.* 2018; Simonin *et al.* 2020)

- Une plus forte concentration en levure fermentaire après les étapes pré-fermentaires pourrait aussi être utilisée pour contrecarrer l'activité des bactéries lactiques

L'ensemble de ces idées sont à associer pour mieux gérer la microflore globale de la cave. 🍷

Bibliographie:



Les références bibliographiques se trouvent sous:

https://www.revuevitiarbohorti.ch/wp-content/uploads/Bibliographie_Audit_Microbiologique_doc_1285.pdf

Les graphiques se trouvent sous:

https://www.revuevitiarbohorti.ch/wp-content/uploads/Annexes_Audit_Microbiologique_doc_1286.pdf



PLANTS DE VIGNE
Pour une viticulture moderne
couronnée de succès

PÉPINIÈRES VITICOLES ANDREAS MEIER & Co SA
5303 Würenlingen | T 056 297 10 00
office@rebschule-meier.ch | www.vignes.ch