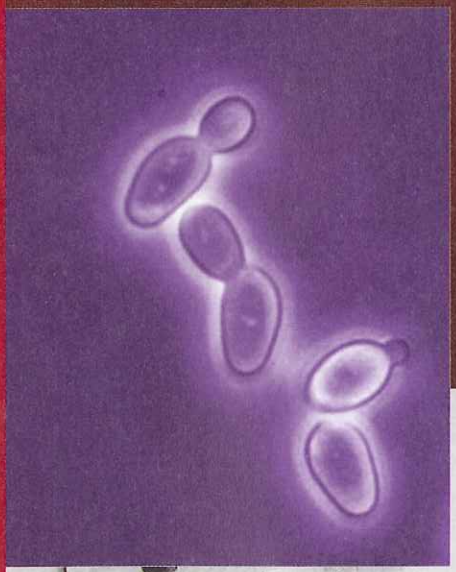
Groupe ICV

Les contaminants microbiologiques :

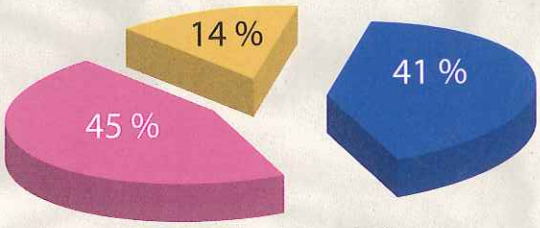
Risques et outils de maîtrise



Edition Janvier 2009

Les contaminants : qui sont-ils ?

Les micro-organismes jouent des rôles bien connus dans le processus de vinification : fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* essentiellement, fermentation malo – lactique généralement par *Œnococcus œni* mais aussi altération par des levures *(Brettanomyces, Pichia...)*, des bactéries acétiques *(Acetobacter)* ou lactiques *(Lactobacillus, Pediococcus...)* qui, à des niveaux divers, produisent des composés indésirables : odeurs soufrées, acidité volatile, amines biogènes, phénols volatils...



Germes viables de vins altérés

- *Brettanomyces* sans Pediocoques
- Pediocoques sans *Brettanomyces*
- Les deux présents

C'est une erreur fréquente que de croire que *Brettanomyces* serait seul présent (et seul responsable) lorsqu'on note des déviations organoleptiques. Une étude menée par l'ICV en 2004 (voir graphe ci-dessus) a en effet montré que sur plus de 200 vins contrôlés dans nos laboratoires parce qu'ils présentaient des notes intenses de type "animal", près de la moitié ne contenait pas de *Brettanomyces* cultivables sur milieu spécifique mais des Pédiocoques.

Des travaux relativement récents permettent de mieux approcher le rôle des bactéries, notamment lactiques. Au-delà de la capacité de certaines à produire en faible quantité des éthyls phénols, elles sont nombreuses (y compris *Œnococcus*) à pouvoir synthétiser des amines biogènes. Ces molécules (cadavérine, putrescine...) sont classées par la plupart des vinificateurs et des œnologues dans la même catégorie sensorielle que celle des éthyls phénols, les notes dites "animales". Outre leur impact organoleptique, ces amines biogènes sont susceptibles d'entraîner des réactions allergiques : elles font l'objet d'études au niveau de l'OIV et pourraient assez rapidement voir leur niveau limité par la réglementation, ce qui n'est le cas aujourd'hui que d'un nombre très réduit de pays parmi lesquels figure la Suisse.

La capacité des bactéries à produire des amines biogènes est **génétiquement déterminée** (enzyme de décarboxylation des acides aminés). Elle est donc devenue à l'ICV un critère incontournable d'évaluation des souches de bactéries lactiques : seules celles n'ayant pas cette aptitude poursuivent le processus de sélection.

Tableau 1 : Principaux contaminants des vins et risques associés

	Agents	Maladie	Principaux Mécanismes	Modification profil visuel	Modification profil organoleptique	Evolution analytique
Bactéries lactiques	***Oenococcus oeni*, pédiocoques, lactobacilles**	Piqûre lactique	Sucre → Ac lactique + acide acétique + CO_2 +...	-	odeur acétique et lactique	Hausse des acidités totale et volatile
		l'Amer	Glycérol → Acroléïnes+ Anthocyanes ⇨ Amertume	-	amertume	-
		Amines Biogènes	Acides aminés→amines biogènes	-	Notes animales, sales	-
		Géranium	Acide sorbique → sorbitol → 2-éthoxyhexa-3,5 diène (seuil de détection : 0.1 mg/L)	-	Odeur de feuille de géranium	-
	Lactobacilles (*L. plantarum* et *L. brevis*)	Tourne	Ac tartrique → ac lactique + ac citrique + CO_2 Ac tartrique → ac succinique + ac acétique +CO_2	**Vin trouble Brunissement**	Odeur lactique, goût plat et mou (choucroute, aigrelet)	Baisse Ac Total, Hausse Ac volatile, baisse Ac tartrique
	Pediococcus damnosus* et *Lactobacillus brevis	la Graisse	Polysaccharide de ß-glucane (mucilage) qui enveloppe les cellules bactériennes et les relie entre elles	**Consistance huileuse, filante et visqueuse**	-	-
Bactéries lactiques /levures	***Lactobacillus brevis*, .. *Brettanomyces***	Goût de souris	Formation de 2-acétyl-tetrahydropuridine (seuil de perception dans l 'eau : 1.6 ng/L)	-	Odeur acétamide dite "urine de souris"	-
Levures	***Candida, Pichia, Hanseluna***	La Fleur	Éthanol → Éthanal → CO_2 + H_2O + Ac organique + acétate d 'éthyle	**Voile blanchâtre en surface du vin**	Production d'acétaldéhyde (évent) Jaunissement et saveur fade	Perte d'éthanol et d'acidité (totale et volatile)
	Brettanomyces		4Vinyl phénol et 4vinyl gaïacol → 4Ethylphénols et 4Ethyl gaïacol	-	Perte aromatique, apparition notes écuries, sueur de cheval, Développement de sécheresse et d'amertume en bouche	-
Bactéries acétiques	**Acétobacter (fin FAL) et gluconobacter (début FAL)**	Piqûre acétique	Oxydation : Ethanol → acide acétique	-	Formation acétate d'éthyle (si faible aération) : Acescence	Augmentation acidité volatile

Quelques rappels de microbiologie

Pour raisonner une stratégie efficace de maîtrise des contaminants microbiologiques, il faut connaître les facteurs qui favorisent, ou pour le moins permettent, l'expression de ces microorganismes.

Il n'existe pas de génération spontanée dans le monde vivant. Même si ce fait semble évident, le rappeler c'est entamer la réflexion sur les causes d'une contamination.

Les trois préalables au développement de contaminants

Trois phénomènes doivent être réunis pour permettre le développement de contaminants et des éventuelles altérations associées :

1. La **présence** ou sensu stricto **la contamination**. Les germes doivent être dans le jus ou le vin : soit qu'ils étaient initialement présents sur le raisin, soit qu'ils étaient présents sur les matériels vinaires (bennes de récolte, quai de réception, cuves, tuyauterie), soit qu'ils ont été involontairement amenés par assemblage avec un autre vin ou jus contaminé.
2. Des **conditions de développement favorables**, c'est-à-dire des nutriments correspondant aux besoins de la ou des souches, une température, un pH, la présence éventuelle d'oxygène dissous, l'absence d'un niveau critique d'antiseptique (SO_2 par exemple), la faiblesse de la pression compétitive... De ces points de vue, la plupart des germes de contaminations sont coriaces : ils se contentent de très peu de nutriments, leurs besoins en oxygène sont souvent faibles voire nuls, certains résistent de manière spectaculaire au SO_2. Par ailleurs, jusqu'à la fin des étapes fermentaires (FAL et FML) les possibilités d'emploi du SO_2 par le vinificateur sont limitées s'il veut voir ces fermentations aboutir. C'est donc essentiellement la pression compétitive exercée par les levures de fermentation puis les bactéries lactiques apportées par le vinificateur qui va limiter les possibilités de développement des microorganismes contaminants.

Contaminants	Niveaux de SO_2 actif limitant	Sources
Bactéries lactiques	0.5 mg / L	Millet et al 1999
Bactéries acétiques	0.8 mg / L	Millet et al 1999
Levures *Brettanomyces*	0.8 mg / L à plus de 1 mg / L	Blateyron et al 2008

3. Du **temps pour se multiplier et produire les composés indésirables**. La plupart des microorganismes, y compris ceux que le vinificateur favorise pour assurer les fermentations, doivent d'abord se multiplier avant de démontrer une activité biochimique significative. Par exemple, pour les *Brettanomyces*, on considère qu'il faut passer le cap des 1000 UFC / mL (Unités Formant Colonie / mL) pour que soit avéré le risque de production de phénols volatils. De ce point de vue, les temps de génération de la plupart des microorganismes contaminants sont longs. Ceci confère un avantage à la fois aux populations intéressantes surtout lorsque l'on ensemence (pour la FA comme pour la FML) mais aussi au vinificateur qui a généralement le temps pour réagir, pour autant qu'il **contrôle régulièrement l'évolution des populations**.

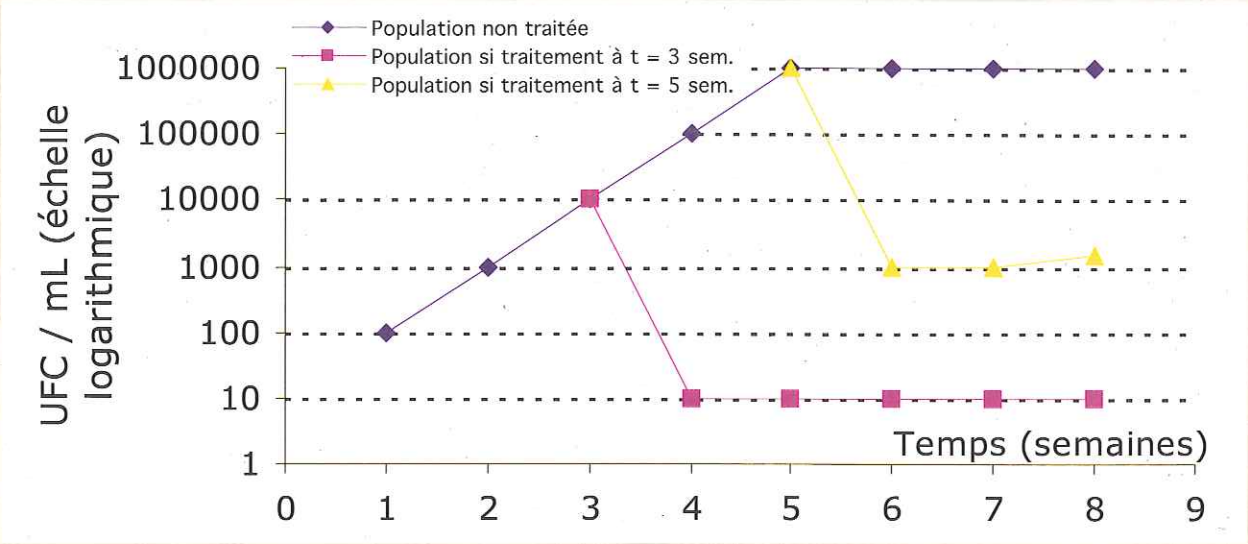
Contaminants	Temps nécessaire au doublement de la population en milieu hydroalcoolique (12%-pH3.5)
Bactéries lactiques	24 heures
Levures *Brettanomyces*	72 heures
Levures *Saccharomyces cerevisiae*	4 heures

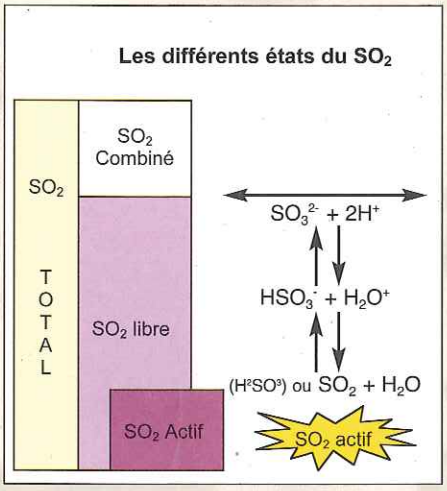
La connaissance de ces préalables permet d'identifier les leviers sur lesquels le vinificateur peut jouer pour réduire le risque à un niveau acceptable.

Les actions correctives n'ont qu'une efficacité imparfaite

La quasi-totalité des actions correctives que l'on peut entreprendre en œnologie **n'élimine qu'une fraction des populations microbiologiques** qui y sont sensibles : sulfitage, centrifugation, filtration, traitement thermique sont plus ou moins efficaces les uns par rapport aux autres mais ils laissent **toujours** des survivants (quelques % ou dixièmes de % de la population). Ceux-ci sont alors susceptibles de recoloniser le milieu et de reprendre leur activité métabolique indésirable.

Comme on n'élimine qu'une fraction des populations, le moment auquel on intervient et l'intensité de la correction sont de première importance. Le graphique qui suit montre l'impact d'un décalage dans le temps d'une action corrective qui éliminerait 99,9% de la population en cours de croissance : si on agit à 10 000 UFC / mL, on réduit la population quasiment à néant mais si on agit à 1 000 000 UFC / mL, la population résiduelle reste supérieure à 1000 UFC / mL.





En outre, l'efficacité de l'action corrective dépend des paramètres physico-chimiques du milieu (vin ou moût) auquel elle est appliquée. C'est bien connu pour le SO_2 dont seule une fraction (SO_2 actif) est réellement efficace contre les microorganismes. Cette fraction est directement dépendante du niveau de SO_2 libre, diminue quand le pH augmente et augmente très légèrement avec le degré alcoolique.

Pour fixer les idées, on obtient 0,6 mg / L de SO_2 actif avec :
26 mg / L de SO_2 libre pour un 13% vol. à pH 3,6
40 mg / L de SO_2 libre pour un 13% vol. à pH 3,8
27 mg / L de SO_2 libre pour un 12% vol. à pH 3,6

On constate donc que, dans certaines situations où il est difficile d'obtenir un niveau adéquat de SO_2 actif, il est particulièrement dangereux de laisser se développer une population contaminante.
Des travaux récents conduits par l'ICV en partenariat avec ADNid et Microflora ont mesuré l'impact du DMDC, nouvel additif autorisé dans l'UE sous conditions et considéré comme un traitement de choc. Les trois vins contenaient la même souche de *Brettanomyces* : on constate que si le DMDC est indubitablement très efficace, il n'élimine pas toute la population.

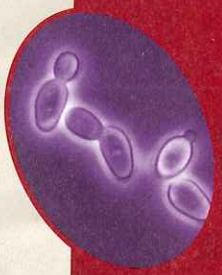
		Brettanomyces en UFC/mL		
Vin	SO_2 actif en mg /L	Avant traitement	Après 1 mois	
			sans DMDC	avec 200 mg / L de DMDC
A	0.3	20 / mL	> 3000 / mL	< 10 / mL
B	0.3	100 / mL	> 3000 / mL	96 / 100 mL
C	0.4	4150 / mL	> 3000 / mL	4 / 100 mL

Enfin, il faut se rappeler que la vie est faite de **cycles** qui se succèdent : la population réduite obtenue suite à une action corrective est susceptible de reprendre son développement pour peu qu'elle retrouve des conditions favorables et qu'on lui laisse le temps.

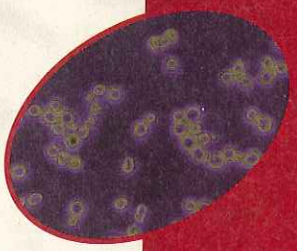
Les règles de travail pour prévenir les risques

Les bonnes pratiques sont au cœur de la problématique

Comme il n'y a pas de génération spontanée, il n'y a pas non plus de fatalité. L'étude de cas concrets montre que dans la large majorité des situations, les contaminations résultent :



- ❑ soit d'un **niveau de risque intrinsèquement élevé**. C'est le cas par exemple des macérations carboniques : même lorsque l'on réalise des délestages précoces, le milieu reste très hétérogène. La compétition entre les "bons" et les "mauvais" microorganismes est moins intense et permet parfois à ces derniers de poursuivre leur développement. On retrouve aussi ce niveau élevé pour des vins issus de vendanges volontairement tardives pour attendre la maturité polyphénolique : les niveaux de pH atteints avec certains cépages comme la Syrah peuvent atteindre ou dépasser une valeur de 4, conduisant à une grande difficulté à maintenir une protection adéquate,
- ❑ soit d'une **évaluation insuffisante du niveau de risque**. Par exemple, considérer qu'une FA terminée sans problème serait garante d'un vin non contaminé ou penser être définitivement tranquille quand les cuves sont pleines, la FML terminée et le sulfitage réalisé sont des sous estimations fréquentes du niveau de risque réel,



- ❑ soit d'une **application incomplète des pratiques qui pourraient limiter les risques** et ce, parfois, même lorsqu'ils sont identifiés. On peut citer des situations aussi triviales que des sulfitages quelques jours après la fin de FML et avant soutirage ou encore la rareté des opérations de détartrage – désinfection en période de production. Cette vigilance trop partielle est souvent le résultat d'un manque de moyens (personnel qualifié, matériel fonctionnel...) ou de carences dans l'organisation (procédure écrites et enregistrées, personnel dédié, analyse de l'historique...)

Lorsque l'on s'attache à l'ensemble du processus de production (récolte – vinification – élevage – conditionnement) on peut identifier les moments clefs où les germes de contamination peuvent trouver des fenêtres pour se développer. En conséquence, il est possible de définir les règles de travail ou les "Bonnes Pratiques" pour minimiser le risque.

L'hygiène reste la base

La propreté apparente mais aussi la désinfection régulière des matériels en contact avec la vendange, le moût puis le vin sont indispensables pour limiter **les contaminations initiales** comme les **contaminations croisées**.

Ce travail commence avec les **matériels de récolte** : sécateurs, seaux, hottes, machines à vendanger, bennes de transport doivent être nettoyés quotidiennement, désinfectés au moins en fin de campagne.

Les quais de **réception**, les canalisations de transport de la vendange, les pressoirs et leurs drains doivent être purgés et nettoyés.

Les **cuves de vinification** (comme les **barriques**) doivent être détartrées idéalement à chaque vidange, désinfectées entre deux fermentations ou en cas de problème de contamination.

Les **tuyaux** de pompage (fixes ou souples) doivent être rincés, doivent pouvoir s'égoutter rapidement et être désinfectés régulièrement avec les pompes auxquelles ils sont reliés.

Les **sols**, les canalisations doivent avoir des pentes suffisantes pour permettre l'évacuation des eaux de lavage et leur surface doit permettre de travailler en sécurité tout en favorisant une bonne hygiène.

Le **sulfitage initial** de la vendange est utile pour favoriser l'implantation des levures de fermentation et diminuer ponctuellement le niveau des contaminants potentiels mais insuffisant pour une protection à moyen terme.

L'état sanitaire de la vendange

Une vendange en **mauvais état sanitaire** libère du jus donc des nutriments pour les germes de contamination, dès la récolte, particulièrement les vendanges atteintes de pourriture acide. La multiplication peut être rapide. Cette situation impose de la traiter de manière séparée et d'appliquer rigoureusement toutes les Bonnes Pratiques : hygiène, sulfitage, maîtrise des fermentations, suivi en élevage...

La maîtrise des fermentations

C'est un point clef aussi bien pour la FA que pour la FML. En effet, la maîtrise des fermentations et des temps de latence entre elles assure une forte pression de compétition et laisse peu de temps aux germes de contamination pour se développer.

La **fermentation alcoolique** doit être gérée en respectant scrupuleusement les 13 points clefs : choix de la souche de levure, dose et qualité de la réhydratation, températures, azote et oxygène raisonnés... Il ne doit bien sûr pas y avoir d'arrêt de FA sans mise en œuvre immédiate d'une procédure raisonnée de reprise.

La fin de FA est particulièrement importante : un ralentissement excessif (moins de 5 points de perte de densité par jour ou plus de 5 jours pour consommer les 15 à 20 derniers g de sucres fermentescibles), à ce moment là, témoigne d'une population de *Saccharomyces* en mauvais état physiologique ou trop faible. C'est alors une occasion très favorable pour les germes de contamination. Rappelons qu'à ce moment là, il y a très peu d'actions correctives possibles pour accélérer la fin de FA. Les apports d'oxygène sont potentiellement plus favorables aux germes de contamination qu'aux levures de FA qui ne sont plus capables d'en profiter.

La **fermentation malo – lactique** est trop souvent négligée, laissée aux "bons soins" des bactéries lactiques indigènes. Cette situation a deux conséquences potentielles graves :

- Les temps de latence peuvent être longs du fait du choix de la levure pour la FA, du cumul des doses de SO_2, de la température, du degré alcoolique, du pH... Pendant ce temps, les bactéries acétiques ainsi que les *Brettanomyces* peuvent se développer, le vin n'étant généralement pas protégé par du SO_2 actif. Il n'est pas rare de voir des fermentations malo-lactiques spontanées rester plus de 30 jours sans signe mesurable d'activité,
- Les bactéries lactiques qui se multiplient ne forment pas une population pure. On peut y retrouver plusieurs souches *d'Œnococcus* dont certaines susceptibles de produire des amines biogènes, en mélange avec des Lactobacilles et des Pédiocoques. Les vins qui "se ferment" aromatiquement à ce stade là ne sont souvent pas autre chose que le résultat du travail de ces populations.

Il est aujourd'hui possible d'implanter une population pure et sans activité décarboxylase pour éviter ces problèmes. L'inoculation dans les 3 à 6 jours suivant la fin de FA ou la co-inoculation levures-bactéries fonctionnent sans problème au niveau industriel dans les caves qui maîtrisent parfaitement cette étape (technique d'ensemencement et température notamment).

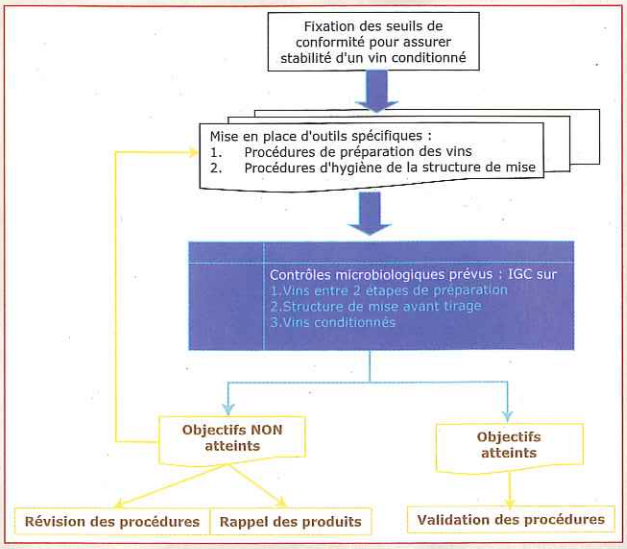
La maîtrise de l'élevage

Lors de l'élevage, c'est essentiellement sur la température et le niveau de SO_2 actif que l'on peut agir. En baissant la température on allonge les temps de génération : on repousse le risque sans l'éliminer. Le SO_2 actif dépend à cette étape là, sauf acidification, du SO_2 libre. Si le pH est relativement bas (< 3,6) non seulement les conditions sont moins favorables aux bactéries lactiques mais encore le SO_2 actif est plus élevé pour un niveau "normal" de libre. Si le pH est haut (> 3,8), c'est l'hygiène qui reste la meilleure arme.

Le plan de contrôle : un outil indispensable pour une prévention des risques et des interventions rapides

Un plan de contrôle est un document construit pour assurer à la fois une prévention des risques et une mise en mémoire des situations rencontrées. Il s'élabore en **trois étapes** qui consistent à :

- fixer les exigences, c'est-à-dire préciser les niveaux de conformité des résultats des contrôles
- établir la nature et la fréquence des contrôles
- définir *a priori* les actions à mettre en œuvre en fonction des non-conformités rencontrées et de leur importance



L'exemple ci-contre illustre ce que peut être un plan de contrôle dans le cas d'une mise en bouteilles.

Le plan de contrôle fait le bilan des actions et des procédures à mettre en œuvre. Il précise les liens entre les étapes comme entre les résultats des contrôles et les réactions à mettre en place.

Au-delà du formalisme du type "Système Qualité", il permet de réunir les acteurs, au moment de sa rédaction, et donc de clarifier les enjeux tout en mobilisant les énergies.

IGC signifie Indice de Germes de Conditionnement : c'est un contrôle microbiologique à 5 jours sur milieu spécifique, pour des vins supposés pauvres en germes.

Ecouvillonnage sur bec de tireuse

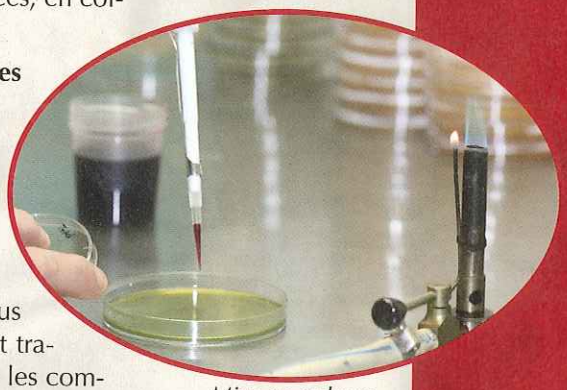
Quelques uns des outils mis à votre disposition par l'ICV

Dans le cadre de sa veille et de ses recherches sur les techniques microbiologiques innovantes, l'ICV est actif depuis plus de 20 ans sur les outils de maîtrise des contaminations par les levures *Brettanomyces*.

Plus généralement, l'ICV a travaillé sur différents procédés de surveillance des microorganismes d'altération.

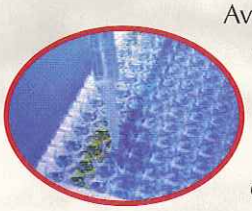
Ainsi différentes techniques, comme l'ATP-métrie ou la fluorimétrie ont été testées, en collaboration avec les centres de recherche de l'INRA et SUPAGRO Montpellier.

Les déterminations des **IGA (indice des germes d'altération)** et **IGC (indice des germes au conditionnement)** ont été développées dans les laboratoires ICV pour apporter, à faible coût, des résultats d'un niveau de précision le plus souvent suffisant pour mettre en place des actions correctives et curatives dans les caves.



Mise en culture sur boîte de Petri

En parallèle des travaux plus fondamentaux ont été poursuivis, en partenariat avec ADNid, une «start-up» hébergée sur l'incubateur de SUPAGRO et qui a développé une expertise en biologie moléculaire dans le vin. Aujourd'hui nous savons identifier les différentes souches de *Brettanomyces* par leur génotype et travaillons sur le comportement spécifique de ces différentes souches, pour mieux les combattre (nos résultats détaillés sont disponibles dans le kiosque de notre site **www.icv.fr**).



Avec notre partenaire ADNid, nous proposons une nouvelle technique analytique au service des plans de contrôle microbiologique : la **PCR quantitative**, mesure spécifique qui apporte une amélioration significative en matière de temps de réponse.

Ces innovations complètent les méthodes traditionnelles de caractérisation des altérations : analyses chimiques (en particulier acidité volatile), analyse sensorielle, dosage des éthyl 4 phénols, ces dernières ne permettant que de confirmer des altérations constatées.

Les solutions analytiques au service de la détection précoce des altérations microbiologiques

	IGA (Indice des Germes d'Altération)	Recherche, identification et quantification de germes d'altération	PCR quantitative
Principe	Mise en culture	Mise en culture et Examen microscopique	Multiplication, isolement, et quantification d'ADN
Délai	10 jours après réception	10 jours après réception	72 h après réception* (*sous conditions)
Expression des résultats	X bactéries type Acetobacter Y bactéries totales Z levures type *Brettanomyces*	V UFC / ml bactéries type *Acetobacter* W UFC / ml bactéries lactiques type pédiocoques X UFC / ml bactéries lactiques type *Oenococcus oeni* Y UFC / ml bactéries lactiques type lactobacilles Z UFC / ml levures type *Brettanomyces*	X UFC/ml levures *Brettanomyces bruxellensis*
Précision de la quantification	+ Classes (<10 ; 10 à 100 ; > 100)	++ 0.5 Log	+++ 5%
Seuil de détection	10 UFC / ml	0,01 UFC / ml	10 UFC / ml
Qualité de l'identification des germes	+	+++ (validation microscopique de la nature des germes et de l'absence d'apiculées parmi les levures non *Saccharomyces*)	++++
Exemples d'utilisation	✓ Suivi d'élevage en routine ✓ Contrôle avant mise	✓ Pour la prévention de toutes les altérations microbiologiques grâce à un suivi régulier de toutes les flores d'altération contaminantes ✓ Pour mettre en place des actions curatives et correctives adaptées après identification d'une contamination (par IGA/IGC, analyse sensorielle…) ✓ Dans le cadre d'expertise	✓ Besoin d'une réponse rapide : avant un assemblage, un traitement de stabilisation microbiologique justifié par les résultats de dégustation, un embouteillage, un achat… ✓ Après des résultats d'IGA montrant une contamination pour la caractériser avec précision ✓ Dans le cadre d'expertise

Document réalisé à partir de l'Edition Spéciale Entreprises du Flash Infos Vendanges « Les contaminants microbiologiques : risques et outils de maîtrise », rédigé par Daniel GRANES, Directeur Scientifique, Lucile PIC Responsable Département R&D, Caroline BONNEFOND, Chargée de Mission à la Direction Scientifique.

Les Flashs infos vendanges sont diffusés aux œnologues conseil du Groupe ICV. C'est une synthèse pratique sur un des points clés des vinifications et des élevages des vins méditerranéens et rhodaniens. Les Flash Infos Vendanges déjà publiés sur les différents thèmes évoqués sont rappelés au fil du texte.
Tous les Flashs sont téléchargeables à partir du site Internet de l'ICV : **www.icv.fr**

ICV
Institut Coopératif du Vin
La Jasse de Maurin 34970 Lattes - FRANCE
e-mail : icv@icv.fr • www.icv.fr

VVS
Vignobles et Vins Services
La Jasse de Maurin - 34970 LATTES
vvs@vvs-oenologie.fr

SOULIÉ Imprimeur Frontignan / Ce document a été imprimé sur presse sans rejets chimiques.