Ecologie microbienne des environnements vinaires : Les *Brettanomyces* sont aussi dans la cave !

Les travaux sur la diversité des souches de *Brettanomyces* l'ont récemment démontré : certaines souches sont plus résistantes à certaines contraintes environnementales que d'autres. La résistance aux sulfites est aujourd'hui bien caractérisée. Notre test TYP*Brett* associe la quantification de la population totale de *Brettanomyces* présente dans un échantillon et le pourcentage de souches résistantes au SO_2 présentes afin de recourir au traitement le plus adapté et d'éviter d'utiliser inutilement de fortes doses de SO_2.

Les analyses TYP*Brett* réalisées sur les raisins à l'approche et au moment des vendanges ont démontré que les souches présentes au vignoble étaient, dans l'immense majorité des cas, des souches sensibles au SO_2. Mais à l'inverse en multipliant les études d'écologie microbienne dans les caves de nos partenaires, nous avons observé que la majorité des souches présentes dans l'environnement de la cave étaient résistantes au SO_2.

Bien évidemment cela ne signifie pas qu'en l'espace d'une saison les souches sensibles au SO_2 apportées évoluent en souches résistantes mais probablement que l'exposition répétée au SO_2 (sulfitage des raisins, des moûts, des vins, des contenants, du petit matériel…) a, sur du long terme, favorisé les phénomènes d'adaptation qui ont permis à certaines souches d'acquérir des outils de résistance.

Malgré les efforts et les technologies développées en termes d'hygiène, l'écologie microbienne de la cave doit donc toujours être prise en compte dans les stratégies de lutte contre les altérations des vins conférées par *Brettanomyces* (mais pas uniquement, c.a.d dans le cadre de stratégies globales de prévention d'altérations microbiennes). L'analyse de ces environnements doit fournir des outils de diagnostics qui permettent d'optimiser certains procédés (nettoyage des contenants, du « petit matériel » …) mais aussi d'identifier les zones sensibles (système d'évacuation des eaux, sols et murs humides, système de climatisation « confiné »…).

Les biofilms sont une notion encore peu caractérisée en œnologie. **Un biofilm est une communauté de microorganismes adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.** Ils existent déjà sur le raisin où une partie de la microflore tapisse la baie de polysaccharides servant de structure d'adhésion et de protection à une microflore plus minoritaire. Ces phénomènes sont aujourd'hui bien connus dans les secteurs hospitaliers et de l'agro-alimentaire où ils peuvent être l'origine de contaminations plus ou moins importantes (maladies nosocomiales, intoxications alimentaires…). Outre les aptitudes adaptatives développées pour adhérer aux surfaces, les biofilms se caractérisent par l'acquisition de phénomènes de résistance offerts par leur organisation synergique. Les microorganismes ayant formé des biofilms développent alors une résistance significative plus élevée que les cultures isolées des mêmes souches. Il est hautement probable que l'œnologie et les caves constituent aussi de remarquables foyers refuges pour les communautés microbiennes basées sur ces organisations symbiotiques et évolutives. Que cela soit dans le cadre d'une meilleure gestion préventive des risques d'altération ou bien tout simplement pour mieux appréhender les équilibres de la vie microbienne dans l'environnement de la cave (qu'il est illusoire de vouloir stériliser) les outils proposés dans ce document ont également pour objectif d'appréhender ces phénomènes et de fournir des informations pratiques (quantité et diversité des microorganismes) ou plus spécifiques (résistance aux sulfites des souches de *Brettanomyces* éventuellement présentes dans ces biofilms).

Pour cela nous avons mis au point et optimisé 4 outils spécifiques d'analyse de la microflore de la cave.

1er outil - L'analyse par écouvillonnage

Le premier système d'analyse est **l'analyse par écouvillonnage**. Cela consiste à utiliser des écouvillons de cotons stériles et à frotter les surfaces à analyser. Les écouvillons sont ensuite placés dans un tampon stérile isotonique. Puis ce dernier peut être utilisé comme un échantillon de vin pour des analyses de dénombrements sur milieux gélosés spécifiques, des détections par PCR ou, dans le cadre de *Brettanomyces*, pour la réalisation du TYP*Brett*. Cette technique est particulièrement adaptée pour les analyses de tuyauterie, des robinets de dégustation, des trous de bondes, des chanfreins et des esquives des barriques (afin de valider un protocole de désinfection efficace sur toute la surface des matériels et des contenants y compris les endroits les plus difficiles d'accès. Il est également possible de réaliser des tests d'ATPmètrie soit directement par écouvillonnage soit indirectement sur le tampon précédemment évoqué. Ces tests d'ATPmètrie sont particulièrement pertinents là où la vie microbienne doit être la plus faible possible (chaine de mise en bouteilles par exemple).

2ème outil - L'analyse par boites de Petri contact

Le second système d'analyse consiste à utiliser des **boites de Petri contact**. Ces boites de Petri peuvent contenir les mêmes milieux nutritifs et sélectifs que les boites de Petri utilisées dans les laboratoires pour des dénombrements sur les échantillons (par filtration ou par étalement) mais elles présentent la particularité de disposer d'une surface interne bombée si bien qu'à leur ouverture elles peuvent être appliquées sur une surface plane. Les microorganismes alors présents sur cette surface adhèrent à la surface de la gélose puis se multiplient lors de l'incubation de la boite de Petri pour ensuite être dénombrés et éventuellement isolés, purifiés et identifiés génétiquement au laboratoire. La boite contact est un outil indispensable afin de valider les temps de traitement vapeur, l'efficacité du méchage ou bien des traitements alternatifs (UV, ozone…). Les boites contact sont particulièrement adaptées à l'analyse de la surface des cuves, des barriques ou des bidons d'ouillage. Concernant les *Brettanomyces*, le test TYP*Brett* peut parfaitement être mis en place sur les colonies obtenues sur des boites de Petri contact contenant un milieu sélectif de *Brettanomyces*.

Boite de Petri contact

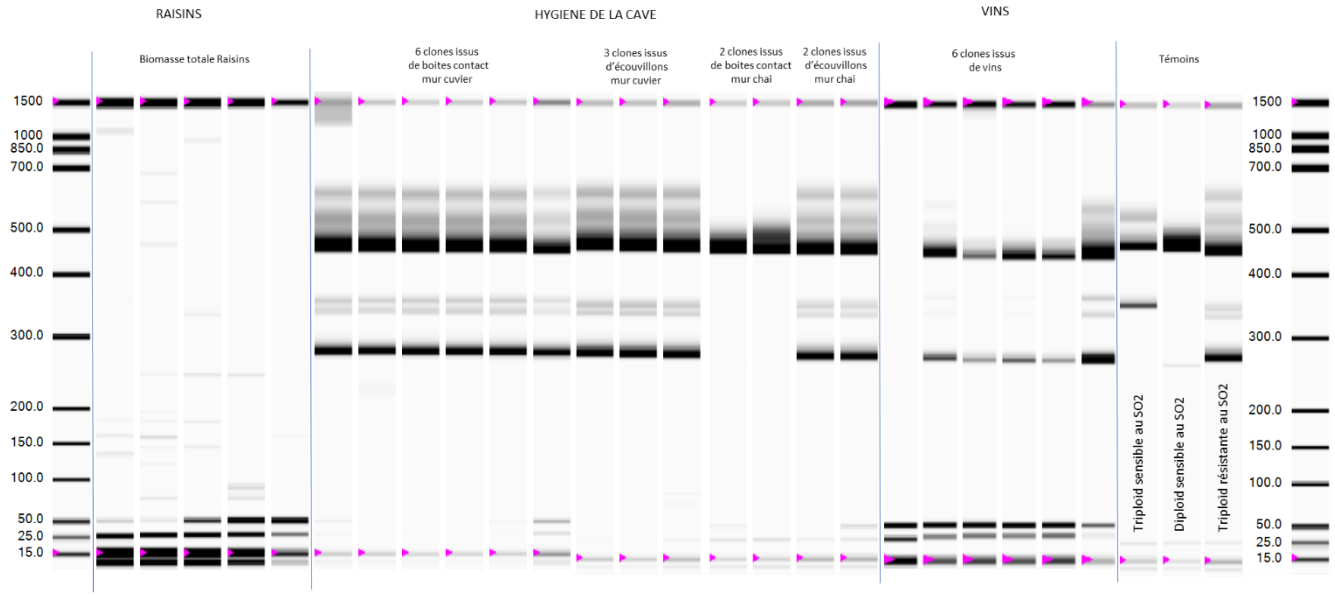
3ème outil - L'aérocollection

Le troisième système est le plus récent en œnologie. Il s'agit d'un système d'aérocollection. Cela consiste à aspirer un volume d'air (généralement 500L) et de l'impulser à la surface d'un milieu de culture sélectif ou de microflore totale. La population qui se développera à la surface de la boite de Petri après la période d'incubation au laboratoire correspond donc à la population microbienne initialement présente dans le volume d'air filtré. Là encore les colonies obtenues sur les géloses peuvent être retravaillées au laboratoire afin d'identifier précisément les germes présents. Un audit complet des différents locaux du chai, permet de comparer les valeurs obtenues au même moment de l'année et de connaitre les risques potentiels des différentes pièces. Dans certains cas ces analyses ont été très utiles pour déceler la présence de moisissures particulièrement productrices d'haloanisoles, de géosmine, d'octénone voire d'amines biogènes susceptibles d'affecter aussi la qualité des vins.

Analyse de cas concret :

A partir de chacun de ces outils analytiques, des souches de *Brettanomyces* peuvent être isolées et classées selon si elles sont diploïdes ou triploïdes et parmi ces dernières lesquelles sont résistantes aux sulfites : c'est l'analyse TYP*Brett*.

Pour exemple, lors d'un audit hygiène complet d'une cave en Amérique du sud, nous avons déterminé la charge microbienne globale environnementale ainsi que la charge microbienne œnologique dans l'air et sur les surfaces. Nous avons collecté de nombreux microorganismes, des moisissures, des levures mais aussi des *Brettanomyces*. L'analyse TYP*Brett* des clones obtenus est illustrée dans la figure ci-dessous.



Sur les raisins analysés de nombreuses levures non-*Saccharomyces* ont été isolées mais aucune *Brettanomyces*. Lors de l'audit hygiène à la cave nous avons réussi à isoler, grâce aux outils précédemment cités, des souches de *Brettanomyces* sur les murs du cuvier et du chai. Les colonies isolées du cuvier avec les deux techniques d'analyses de surface sont toutes résistantes aux sulfites alors que celles isolées avec les mêmes outils dans le chai présentent plus de diversité. Dans le chai on confirme la présence de *Brettanomyces bruxellensis* mais seulement 50% des individus isolés sont résistants aux sulfites. L'analyse statistique des colonies des vins de la cave révèle la présence majoritaire de souches triploïdes résistantes. Par conséquent, les souches de *Brettanomyces* résistantes aux sulfites et contaminantes des vins seraient originaires de l'environnement de la cave, et notamment des surfaces du cuvier (suspicion de formation de biofilm).

4ème outil - Pour aller encore plus loin : le Quick Trap®

Dans le cadre de suspicion de développements microbiologiques atypiques, le quatrième système, le dispositif **Quick Trap®,** consiste à analyser les composés volatils présents dans la cave dont un grand nombre peuvent découler d'activités microbiologiques. Il s'agit d'un capteur passif de PDMS, un polymère sur lequel l'immense majorité des molécules volatiles présentes dans l'atmosphère viennent adhérer.

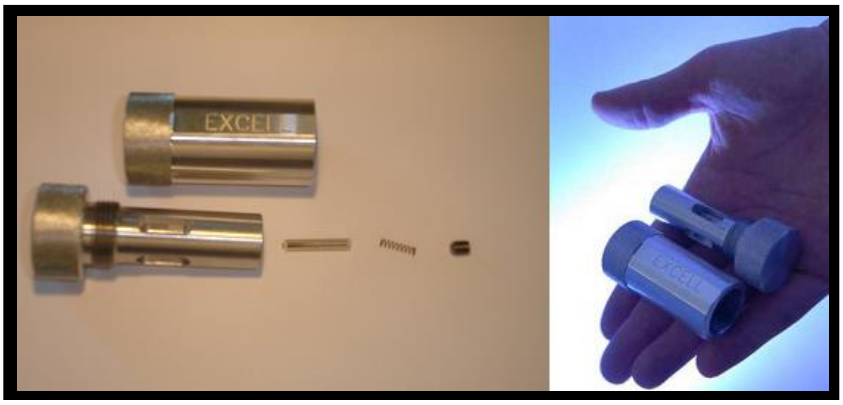
Ce dernier permet d'aborder aussi bien des problématiques d'odeur (anisoles pour les notes « moisi », Géosmine pour le caractère terreux) que sanitaires à travers la recherche de composés à la toxicité avérée par inhalation. Les problématiques de mauvaises odeurs étant très communes dans les caves humides et anciennes, un screening Quick

Trap® permettra l'identification des possibles molécules responsables et aussi de confirmer l'amélioration de la qualité de l'air suite aux travaux d'assainissement des locaux.

La versatilité de ce système permet d'appréhender un large éventail de polluants organiques, d'éviter d'éventuelles aérocontaminations mais également de fournir des informations sur les différents phénomènes en jeu dans le bâtiment

L'identification et le dosage de l'Isoborneol dans l'atmosphère d'un chai seront notamment un excellent indicateur de l'activité fongique en action dans la zone étudiée, ce dernier étant libéré par des sols humides ou bien encore des eaux de surface. Un suivi dans le temps permet par exemple d'évaluer l'efficience des moyens de ventilation et d'humidification des locaux mais également d'anticiper d'éventuelles nuisances olfactives. Ces données sont directement liées à la composition de biofilms ou de la microflore présente dans l'atmosphère car la production de composés comme des haloanisoles mais également d'autres composés susceptibles d'impacter la qualité des vins sont directement liés à la présence de certaines moisissures et bactéries.

Conçu pour proposer une utilisation simplifiée, une fois le Quick Trap® exposé dans l'atmosphère étudiée, les molécules piégées sont désorbées puis traitées en laboratoire à l'aide d'outils analytiques de pointe (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) permettant un dosage particulièrement précis.



En conclusion

Analyser la microflore présente dans l'environnement de travail de la cave est donc désormais possible. Ces données sont essentielles afin de bien appréhender les équilibres microbiologiques qui règnent entre la matière première (le raisin et le vin) et les outils utilisés pour la vinification et l'élevage mais aussi les influences de certaines pratiques d'hygiène. Les paramètres de l'environnement (température et hygrométrie en tête) et les outils de contrôle (climatisation…) sont également des phénomènes à étudier avec soin.

Concernant *Brettanomyces*, les souches résistantes aux sulfites ont fait de la cave leur refuge. Néanmoins certaines zones semblent plus sensibles que d'autres. Les identifier et déterminer les outils qui permettent de limiter la domestication des *Brettanomyces* est une part essentielle pour une lutte adaptée et efficace contre les altérations microbiennes des vins. Cela évite également de recourir massivement ou systématiquement au sulfitage des environnements de travail afin d'éviter aussi les phénomènes de coopération et/ou d'acquisition directe de résistance génétique (cas de la triploïdie des souches de *Brettanomyces* qui sont détectées par le test TYP*Brett*).

Tous les outils évoqués dans ce document peuvent être utilisés à votre demande par nos experts lors d'études d'écologie microbienne de la cave ou lors d'audits mais ils peuvent aussi être commercialisés sous forme de packs afin d'être utilisés directement par vos soins et par vos partenaires locaux.

Pour toute demande complémentaire : vrenouf@sarco.fr