

# Ecologie microbienne de vins de la Vallée du Rhône en période d'élevage

## Microbial ecology of Vallée du Rhône wines during ageing

**RÉSUMÉ :** Cette étude porte sur l'isolement et l'identification de flores microbiennes d'élevage des vins de la Vallée du Rhône.

Trente et un échantillons du millésime 2003 ont été prélevés dans douze caves réparties sur l'ensemble de la Vallée du Rhône. Les vins prélevés sont caractérisés, en moyenne, par un titre alcoométrique volumique, un pH et une teneur en SO<sub>2</sub> libre élevés, ainsi qu'une acidité totale faible. Les bactéries lactiques semblent être les micro-organismes les mieux adaptés à ce type de vin, puisqu'elles sont largement majoritaires par rapport aux bactéries acétiques et aux levures, dont les *Brettanomyces*.

Une étude statistique a permis de mettre en relation les populations présentes dans les vins avec les paramètres œnologiques. Les vins présentant les plus fortes proportions de micro-organismes ont des pH élevés, de faibles taux de SO<sub>2</sub> moléculaire et/ou des TAV faibles. Ces vins proviennent majoritairement des Côtes du Rhône Septentrionales. De plus, ils contiennent de grandes populations de bactéries lactiques du genre *Pediococcus* qui sont absentes des vins plus acides. Cette étude a donné une vision ponctuelle de l'écologie microbienne des vins en cours d'élevage. Il est désormais nécessaire de mieux comprendre la physiologie de micro-organismes tels que *Brettanomyces* ou *Pediococcus* afin de pouvoir prévoir leur éventuel développement dans les vins.

**MOTS-CLÉS :** écologie, microflore d'altération, vin, élevage.

**ABSTRACT :** This study deals with the isolation and identification of microbial flora from ageing Rhone Valley wines.

Thirty one samples (vintage 2003) were taken in twelve cellars distributed among the whole Rhone Valley. These wines were characterized by high alcoholic content by volume, pH and free sulphur dioxide content but also by a low total acidity. The lactic acid bacteria are the micro-organisms that adapt the most to this kind of wine, since they are the most important population compared to acetic acid bacteria and yeasts, including *Brettanomyces*. A statistical study made it possible to correlate the populations present in wines with the enological parameters. The most important populations of micro-organisms were isolated from wines characterized by a high pH, a low free sulphur dioxide content and/or a low alcoholic content by volume. These wines come from the north of the Rhone Valley. Moreover, they contain large populations of lactic acid bacteria of the genus *Pediococcus*, which are not isolated from more acidic wines.

This study gave a limited vision of the microbial ecology of ageing wines. It is now necessary to better understand the physiology of micro-organisms such as *Brettanomyces* or *Pediococcus* in order to foresee their possible development in wines.

**KEY WORDS :** ecology, spoilage microflora, wine, ageing.



### INTRODUCTION

Inter Rhône est impliqué depuis 2001 dans un programme d'étude régional intitulé "programme ferment". Le but initial est de sélectionner et caractériser des ferments spécifiques aux filières viande, lait et fromage. Depuis plus de vingt ans, le Service technique d'Inter Rhône sélectionne des souches de levures régionales pour la vinification. Aujourd'hui, les producteurs disposent d'une gamme de souches complémentaires adaptées à la diversité des matières premières et à la multiplicité des objectifs de production de la Vallée du Rhône. De plus, l'ITV, partenaire du programme Ferment, travaille à la sélection de levures adaptées à la vinification en Beaujolais. En complémentarité de cette étude, le programme pour les Côtes du Rhône est orienté vers un autre sujet : mieux connaître l'écologie microbienne, principalement les flores responsables d'altérations dans les vins. La mise en place de ce programme en Vallée du Rhône répond à une demande croissante des professionnels qui veulent prévenir les phénomènes d'altération des vins.

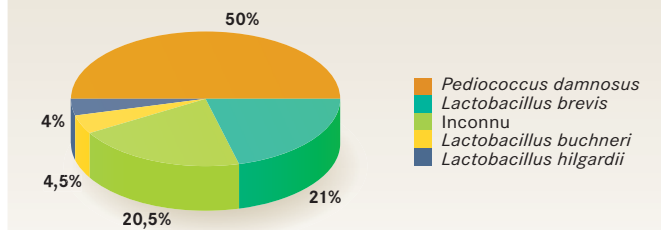
L'élevage est une étape clé qui conditionne la bonne réussite de la mise en bouteilles. A ce stade de la vie du vin, une grande variété de micro-organismes est capable de se développer et leur croissance s'accompagne parfois d'altérations organoleptiques. Inter Rhône a mené une étude sur des vins du millésime 2003, sur l'ensemble de la Vallée du Rhône, pour mieux appréhender l'écologie de ces micro-organismes et de recenser les populations présentes durant l'élevage pour les mettre en relation avec les paramètres œnologiques des vins. L'objectif de cette étude est de répondre aux interrogations suivantes : quels sont les micro-organismes qui présentent potentiellement le plus de risques et quels sont les vins potentiellement les plus exposés ?

### PRÉAMBULE - MILLÉSIME 2002

Inter Rhône a déjà mené une campagne similaire sur les vins du millésime 2002, durant l'élevage, mais seules les bactéries lactiques avaient été dénombrées. 40 échantillons de vins ont été prélevés dans la Vallée du Rhône, 20 dans la partie septentrionale et 20 dans la partie méridionale. Les bactéries lactiques ont été dénombrées, isolées (à raison de 5 colonies par boîte de Pétri), mises en collection puis identifiées génétiquement. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées en parallèle dans l'intention de mettre en relation la présence de souches et les paramètres physico-chimiques des vins.

Les bactéries lactiques du vin sont particulièrement difficiles à cultiver en laboratoire. Sur les 200 souches de départ, seulement 133 ont été identifiées et mises en collection. Les autres ont été perdues par épuisement après plusieurs repiquages successifs. L'identification génétique a été réalisée par le laboratoire SIGMO-ITV. Les identifications génétiques ont abouti aux résultats de la figure 1. On retrouve une part importante de *Pediococcus damnosus* et peu d'autres espèces différentes

Figure 1 : Résultats des identifications des bactéries lactiques - millésime 2002



(fig. 1). La prédominance de *Pediococcus* et la faible variabilité génétique constituent un résultat surprenant. Cette constatation nous a amené à explorer d'autres pistes méthodologiques pouvant garantir l'absence de sélection de souches au cours des différentes étapes de repiquage.

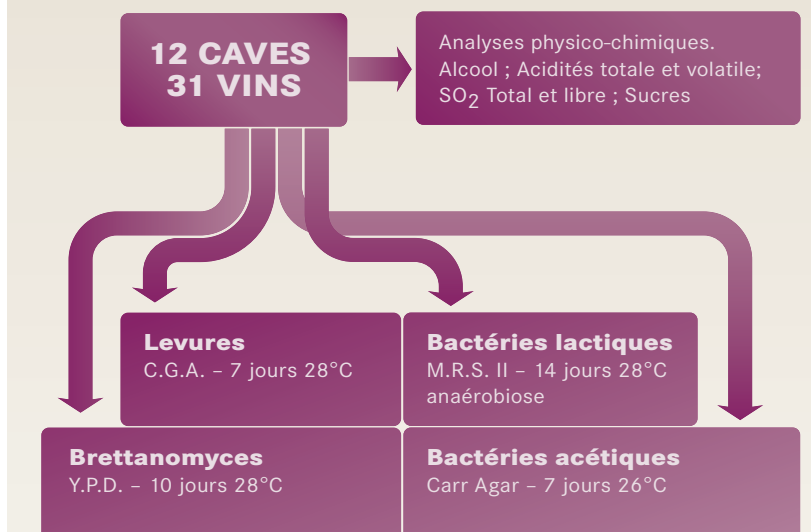
L'absence d'*Enococcus oeni*, principale bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique, est également une source d'interrogation. Cette absence pourrait être liée au déclin naturel de la bactérie dès la fin de la fermentation.

Les résultats de cette étude sur le millésime 2002 devaient donc être vérifiés en utilisant d'autres méthodologies. De plus, le dispositif expérimental devait être amélioré pour permettre de corréler la présence des espèces bactériennes avec les paramètres physico-chimiques des vins, ce qui n'avait pas été possible lors de cette étude, car les caractéristiques des vins prélevés étaient trop proches.

### MATÉRIEL & MÉTHODES - DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Trente et un échantillons du millésime 2003 ont été prélevés dans 12 caves, réparties sur l'ensemble de la Vallée du Rhône avec 2 à 4 échantillons par cave. Seize échantillons proviennent des Côtes du Rhône septentrionales et 15 des Côtes du Rhône méridionales. Parmi les 12 caves, 4 ont été choisies car elles ont déjà rencontré des problèmes d'altérations microbiologiques les années précédentes.

Figure 2 : Protocole analytique



Dans chaque cave, deux vins aux caractéristiques analytiques différentes ont été prélevés (dans la mesure du possible). Les résultats du millésime 2002 ont défini cette orientation méthodologique. Les vins prélevés ont ainsi été choisis de façon à représenter la plus grande variété analytique possible, afin de déterminer les paramètres pouvant expliquer le développement des différentes classes de micro-organismes. Cette variabilité est la garantie qui permet une interprétation statistique fiable des données et la mise en relation des paramètres œnologiques avec la présence des souches. Les prélèvements ont été réalisés au moyen de matériels stériles (flacons, tuyaux...). Les échantillons sont analysés au laboratoire (Fig. 2). Les paramètres œnologiques classiques sont déterminés (alcool, pH, acidités totale et volatile, SO<sub>2</sub> total et libre, sucres) et les populations microbiennes sont dénombrées (levures totales, levures du genre *Brettanomyces*, bactéries lactiques et

acétiques). Les résultats sont exprimés en Unités Formant Colonie par millilitre (UFC/mL).

Après dénombrement, pour chaque échantillon de vin, des colonies sont prélevées, en vue de constituer une collection de germes d'altération des vins. Elles sont choisies sur un critère visuel, leur morphologie. Chaque type morphologique de colonie est prélevé dans la limite de 5 colonies (pour les levures, bactéries acétiques et *Brettanomyces*), à 10 colonies (bactéries lactiques). Dix colonies de bactéries lactiques sont prélevées car ce sont les micro-organismes qui sont les plus nombreux à ce stade d'évolution du vin. Dans le cas où il y a peu de colonies différentes, on prélève plusieurs colonies identiques. Cela permettra de confirmer qu'une même colonie équivaut au même genre voire à la même espèce microbienne. On note les proportions des différents types de colonies prélevées sur la boîte de Pétri ainsi que leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

L'ensemble des résultats est ensuite traité statistiquement par Analyse en Composantes Principales (ACP) et Analyse Factorielle Discriminante (AFD), au moyen du logiciel Statlab 3.0.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION - MILLÉSIME 2003

### ANALYSE ET INTERPRÉTATION DES DONNÉES

#### ŒNOLOGIQUES ET MICROBIOLOGIQUES

L'examen des paramètres œnologiques est un préalable indispensable pour apporter des explications quant à la présence des différentes espèces microbiennes. La figure 3 représente la distribution des 31 vins en fonction des quantités de levures et bactéries ainsi que des paramètres œnologiques : alcool, sucres, pH et SO<sub>2</sub> libre.

Les taux d'alcool sont élevés, puisque 42 % des vins ont des teneurs comprises entre 14 et 16 % vol. Les taux de SO<sub>2</sub> libre sont assez élevés, avec des teneurs supérieures à 20 mg/l dans 68 % des échantillons. Les pH sont également élevés, avec une majorité de vins dont le pH est supérieur à 3,8. Enfin, des acidités totales qui restent faibles, puisque 77 % des échantillons présentent une acidité totale inférieure à 3,5 g/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Les populations microbiennes sont assez variables d'une cave à l'autre. Les populations de levures restent relativement faibles, puisqu'une majorité de vins présentent des populations < 10 UFC/mL. Les levures sont toutefois présentes dans 15 échantillons sur 31, à des niveaux de population pouvant atteindre jusqu'à 10<sup>4</sup> UFC/mL. La présence de levures est toujours problématique car elle peut causer des refermentations ou produire des composés indésirables, tel que le carbamate d'éthyle (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Les levures du genre *Brettanomyces* ont pu être dénombrées dans 10 % des échantillons, mais à des taux relativement faibles, de l'ordre de 10<sup>2</sup> UFC/mL. Mais *Brettanomyces* étant capable de s'implanter et de se développer facilement, même de telles concentrations restent potentiellement un risque.

Quant aux bactéries, leur présence est importante dans les vins en élevage. Les bactéries lactiques sont abondantes, puisqu'elles sont présentes dans 22 vins sur 31, avec des concentrations pouvant atteindre 10<sup>6</sup> UFC/mL. Les bactéries lactiques sont capables d'altérations variées, particulièrement à de telles concentrations. Le maintien de tels niveaux de population est donc un risque majeur. Les bactéries acétiques sont encore plus fréquentes – elles sont présentes dans 24 vins sur 31 – mais leurs populations dépassent rarement les 10<sup>4</sup> UFC/mL. L'altération causée par les bactéries acétiques – la piqûre acétique – est grave mais reste relativement rare. A ces niveaux de populations, les bactéries acétiques ne sont capables que d'une altération réduite.

Le tableau 1 permet d'avoir une vision globale de ces vins prélevés, puisque la moyenne de tous les vins a été calculée pour chaque paramètre. Cette approche permet de mettre en relation plus aisément les paramètres œnologiques et microbiologique. Le profil moyen des différents vins prélevés indiquent un titre alcoométrique volumique, un pH et une teneur en SO<sub>2</sub> libre élevés, ainsi qu'une acidité totale faible. Les bactéries lactiques semblent être la catégorie de micro-organismes la plus adaptée à ce type de vin, puisqu'elles sont largement majoritaires par rapport aux bactéries acétiques puis aux levures, dont les *Brettanomyces*.

#### SÉLECTION DES VARIABLES DISCRIMINANTES

Une ACP a été réalisée sur l'ensemble des données (tableau 2). Les axes 1 et 2 de cette ACP représentent 40,5 % de la variabilité. L'examen des quatre premiers axes explique 65 % de l'information.

Cette ACP nous permet de conclure que le pH et le SO<sub>2</sub> moléculaire explique l'axe 1 car ils sont fortement corrélés à cet axe. Le SO<sub>2</sub> libre est un peu moins corrélé à cet axe (corrélation de 0,55).

Le TAV est la variable la plus corrélée à l'axe 2. On peut considérer que l'axe 2 est un axe degré alcoolique.

Le TAV, le pH et le SO<sub>2</sub> moléculaire et total sont les variables qui paraissent les plus discriminantes. Cette ACP seule ne permet pas d'interprétations simples de l'ensemble de nos données, il est donc nécessaire de réaliser d'autres traitements statistiques. Ces variables identifiées comme discriminantes permettront de réaliser une analyse factorielle discriminante, après regroupement des individus.

#### REGROUPEMENT DES ÉCHANTILLONS PAR CLASSE

Pour une exploitation plus aisée des résultats, il est intéressant de regrouper les échantillons. Afin de former des classes relatives aux caractéristiques physico-chimiques des vins, une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) des échantillons est réalisée à partir des variables discriminantes préalablement définies.

Le but de ces regroupements est d'obtenir un minimum de variance intra-classes, ce qui dénote une

**Tableau 1 : Valeurs moyennes des paramètres œnologiques et microbiologiques des 31 vins prélevés**

|            | TAV % volume | AT g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | pH          | Sucres Réducteurs g/l | SO <sub>2</sub> libre mg/l | Bactéries Lactiques UFC/ml | Bactéries Acétiques UFC/ml | Levures UFC/ml | Brettanomyces UFC/ml |
|------------|--------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
| Moyenne    | <b>13,75</b> | <b>3,23</b>                           | <b>3,83</b> | <b>1,9</b>            | <b>23,9</b>                | <b>52906</b>               | <b>2121</b>                | <b>292</b>     | <b>10</b>            |
| Ecart type | 1,19         | 0,39                                  | 0,18        | 0,6                   | 8,4                        | 212995                     | 4457                       | 590            | 14                   |
| Médiane    | 13,59        | 3,23                                  | 3,86        | 1,7                   | 24                         | 4305                       | 1090                       | 430            | 160                  |
| Maximum    | 15,95        | 4,03                                  | 4,25        | 4,1                   | 47                         | 985000                     | 18600                      | 1980           | 170                  |
| Minimum    | 11,24        | 2,54                                  | 3,46        | 1,2                   | 6                          | <10                        | <10                        | <10            | <10                  |

**Tableau 2 : Tableau résumé des variables corrélées aux axes 1 à 4**

|                             | AXE 1        |             |             | AXE 2       |             |             | AXE 3        |             |             | AXE 4       |             |             |
|-----------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                             | Coord        | Cor         | Ctr         | Coord       | Cor         | Ctr         | Coord        | Cor         | Ctr         | Coord       | Cor         | Ctr         |
| BRETT                       | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          | <b>-0,84</b> | <b>0,71</b> | <b>0,39</b> | ns          | ns          | ns          |
| TAV                         | ns           | ns          | ns          | <b>0,76</b> | <b>0,57</b> | <b>0,27</b> | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          |
| pH                          | <b>-0,87</b> | <b>0,75</b> | <b>0,24</b> | ns          | ns          | ns          | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          |
| SO <sub>2</sub> Total       | <b>0,74</b>  | <b>0,55</b> | <b>0,18</b> | ns          | ns          | ns          | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          |
| Malique                     | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          | ns           | ns          | ns          | <b>0,81</b> | <b>0,66</b> | <b>0,48</b> |
| SO <sub>2</sub> moléculaire | <b>0,90</b>  | <b>0,82</b> | <b>0,26</b> | ns          | ns          | ns          | ns           | ns          | ns          | ns          | ns          | ns          |

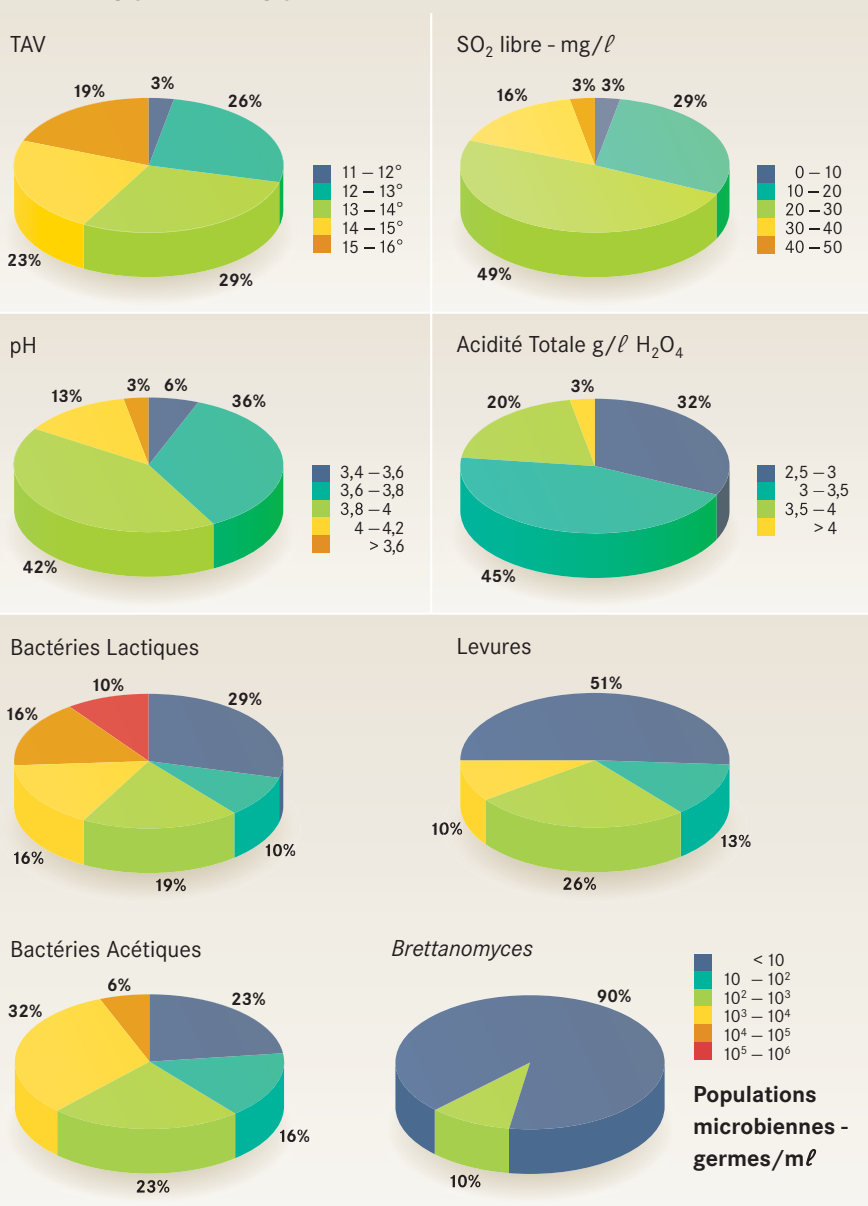
ns : valeurs non significatives

**Tableau 3 : Valeurs moyennes des variables pour les différentes classes**

| CLASSES (nombres d'individus)                          | CLASSE 1 (8) | CLASSE 2 (7)  | CLASSE 3 (6)    | CLASSE 4 (8)  | CLASSE 5 (2)                  | Population totale |
|--|--------------|---|-----------------|---|-------------------------------|-------------------|
| Bactéries lactiques (UFC/mL)                           | 66 579       | 9 420   | 9 207           | 123 285   | 0                             | <b>52 906</b>     |
| Bactéries acétiques (UFC/mL)                           | 2 929        | 4 900   | <b>7</b>        | 628   | 1 475                         | <b>2 121</b>      |
| Levures (UFC/mL)                                       | 355          | 441   | <b>8</b>        | 383   | <b>0</b>                      | <b>292</b>        |
| Brettanomyces (UFC/mL)                                 | 19           | 0   | 0               | 21  | 0                             | <b>10</b>         |
| TAV (% volume)   | 13,14        | <b>12,55</b>  | <b>15,63</b>    | 13,85   | <b>14,42</b>                  | <b>13,75</b>      |
| Acidité Totale (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )   | 3,11         | 3,30  | 2,98            | <b>3,49</b>   | 3,21                          | <b>3,23</b>       |
| Acidité Volatile (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 0,46         | 0,39  | 0,49            | 0,51  | 0,49                          | <b>0,47</b>       |
| pH   | <b>3,99</b>  | 3,85  | 3,91            | <b>3,68</b>   | <b>3,54</b>                   | <b>3,83</b>       |
| Sucres réducteurs (g/l)                                | <b>1,6</b>   | <b>1,6</b>  | 2,1             | 2   | 2,9                           | <b>1,9</b>        |
| SO <sub>2</sub> total (mg/l)                           | <b>40,5</b>  | <b>57,1</b>   | <b>56,7</b>     | <b>110,6</b>  | <b>91,5</b>                   | <b>68,8</b>       |
| SO <sub>2</sub> libre (mg/l)                           | 19,3         | <b>29,9</b>   | 18,8            | 23,8  | <b>37,0</b>                   | <b>23,9</b>       |
| Acide malique (g/l)                                    | 0,1          | 0,1   | 0,2             | 0,1   | 0,2                           | <b>0,1</b>        |
| SO <sub>2</sub> moléculaire calculé (mg/l)             | <b>0,1</b>   | 0,3   | 0,2             | 0,3   | <b>0,7</b>                    | <b>0,3</b>        |
| Cépages  | • Syrah 100% | • Grenache/Syrah 29%<br>• Syrah 29%<br>• Grenache 71% | • Grenache 100% | • Grenache/Syrah/Mourvèdre 37,5%<br>• Grenache 37,5%<br>• Syrah 25% | • Syrah 50%<br>• Marianne 50% |                   |

certaine homogénéité des échantillons, et un maximum de variance inter-classes et montre que les classes sont différentes entre elles. La CAH a permis d'obtenir 5 classes, avec une variance intra classe de 22,1 % de la variance totale et une variance inter classe de 77,9 % de la variance totale. La moyenne des différentes caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des individus constituant les classes est répertoriée dans le tableau 3. Les moyennes apparaissant en rouge signifient que les échantillons de la classe ont tous des valeurs supérieures à la moyenne de la population totale, ceux apparaissant en bleu ont tous des valeurs inférieures à la moyenne de la population totale. Seules ces moyennes, significativement différentes des

**Figure 3 : Répartition des vins prélevés en fonction des paramètres microbiologiques et œnologiques**



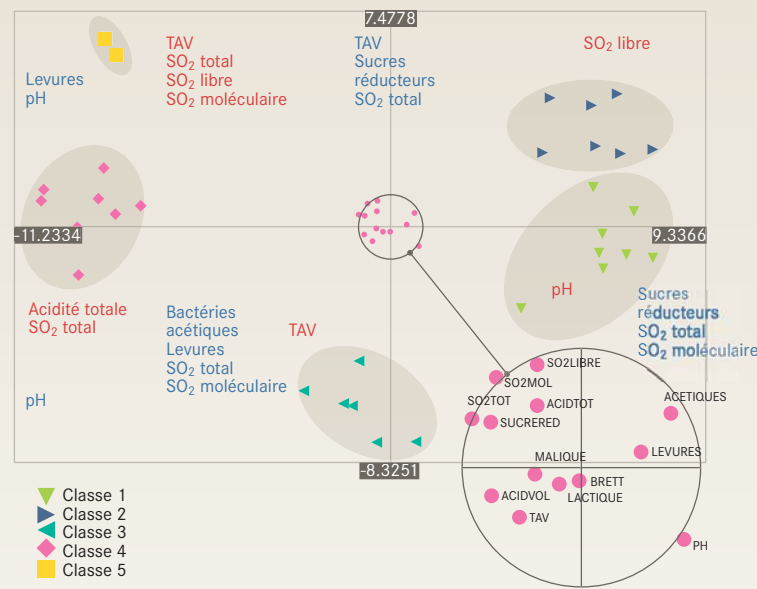


Figure 4 : Représentation des variables et des échantillons par AFD

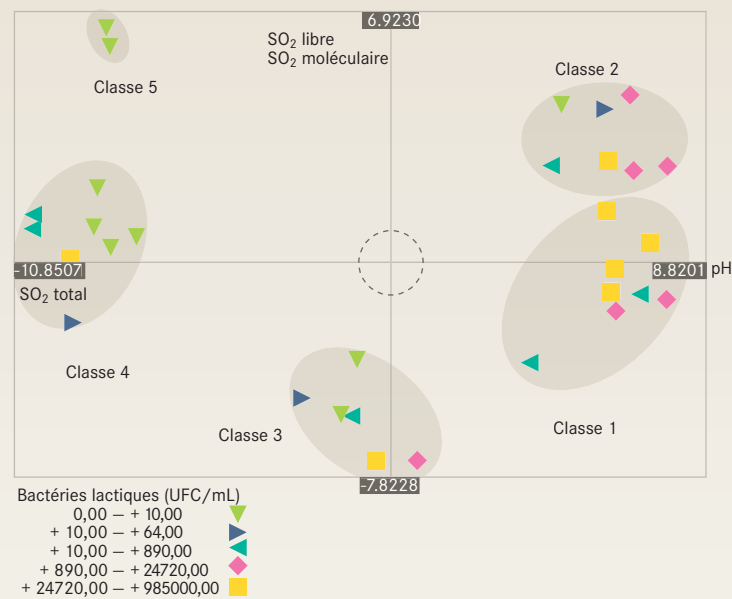


Figure 5 : Stratification des échantillons selon le nombre de bactéries lactiques

moyennes de la population totale, sont commentées. La classe 1 est caractérisée par un pH plus important que dans l'ensemble des échantillons (3,99 contre 3,83). De plus, les teneurs en SO<sub>2</sub> total et moléculaire sont faibles (respectivement 40,5 et 0,1 mg/l contre 68,8 et 0,3 mg/l). Enfin la teneur en sucres réducteurs est en dessous de la moyenne de la population totale (1,6 contre 1,9 g/l). Cette classe est composée essentiellement de vins issus des Côtes du Rhône Septentrionales (7 vins sur 8), tous les vins sont à base de Syrah. La classe 2 comprend des vins ayant des faibles TAV (12,55 % contre 13,75 % pour la moyenne de l'échantillon) et des taux de sucres réducteurs faibles (1,6 contre 1,9 g/l). La teneur en SO<sub>2</sub> total est faible mais le SO<sub>2</sub> libre est élevé (respectivement 57,1 et 29,9 mg/l contre 68,8 et 23,9 mg/l). Cette classe, regroupant 7 échantillons, comporte 5 vins des Côtes du Rhône Septentrionales et de cépage Syrah.

La classe 3 regroupe des vins contenant des populations faibles de bactéries acétiques et de levures (respectivement 7 et 8 UFC/ml contre 2121 et 292 UFC/ml). Ces faibles valeurs peuvent être expliquées par un fort TAV (15,63 %). Cependant la population de bactéries lactiques est dans la moyenne de l'échantillon, l'alcool ne semble pas les inhiber, mais un pH élevé (3,91) ainsi que des taux de SO<sub>2</sub> total et moléculaire plus bas que la moyenne (respectivement 56,7 et 0,2 mg/l) favoriseraient leur survie. L'ensemble des échantillons de cette classe provient des Côtes du Rhône Méridionales et le cépage est le Grenache.

La classe 4 met en évidence des vins ayant une acidité totale élevée (3,49 contre 3,23 g/l d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) un pH bas (3,68 contre 3,83), ainsi qu'une teneur en SO<sub>2</sub> total importante (110,6 contre 68,8 mg/l). 6 vins sur 8 proviennent des Côtes du Rhône Méridionales et résultent d'un assemblage Grenache / Syrah / Mourvèdre.

La classe 5 comporte des échantillons de vins sans levure ni bactérie lactique que l'on peut mettre en relation avec les teneurs en SO<sub>2</sub> total, libre et moléculaire relativement élevées (respectivement 91,50 ; 37 et 0,7 mg/l contre 68,8 ; 23,9 et 0,3 mg/l), un pH relativement bas (3,54) et un TAV important (14,42 contre 13,75). Les bactéries lactiques sont plus sensibles au SO<sub>2</sub> que les levures et les bactéries acétiques. Les deux vins composants cette classe proviennent des Côtes du Rhône Septentrionales.

#### ANALYSE FACTORIELLE DISCRIMINANTE

L'AFD permet d'expliquer une variable principale à l'aide de variables explicatives. Les variables explicatives sont l'ensemble des variables caractérisant les échantillons. Les cinq classes définies par la CAH sont donc traitées par AFD, en fonction des variables discriminantes issues de l'ACP, à savoir pH, TAV, SO<sub>2</sub> moléculaire et total.

Les deux premiers axes représentent 90 % de la variabilité. Le plan principal contient donc 90 % de l'information. L'axe 1 oppose des vins à fort pH à des

vins à taux de SO<sub>2</sub> total important. L'axe 2 est surtout caractérisé par le SO<sub>2</sub> libre (fig. 4). Sur la figure 4, à côté de chacune des classes, matérialisées par des cercles englobant les échantillons, les variables pour lesquelles la moyenne de la classe est différente de la moyenne de la population sont indiquées (en rouge pour les moyennes supérieures et en bleu pour les moyennes inférieures). Ces informations permettent de visualiser les caractéristiques qui distinguent les classes les unes par rapport aux autres mais aussi par rapport à l'ensemble de la population.

Afin de mettre certains résultats en lumière, il est possible de stratifier les échantillons selon différentes variables. Les échantillons restent à leur place sur le graphique, mais leur couleur change en fonction de la variable. La première stratification est celle réalisée avec la variable bactéries lactiques (fig. 5).

On s'aperçoit que les vins situés à droite du graphique (classes 1 et 2) ont des populations importantes en bactéries lactiques. 2/3 des échantillons ont des populations de bactéries lactiques supérieures à 890 UFC/ml. Ces vins présentent des conditions plus favorables à leur développement, pH élevé et TAV faible (pour la classe 2). Ces vins sont difficiles à stabiliser microbiologiquement car il y a une perte d'efficacité du SO<sub>2</sub> et une grande diversité des espèces et des souches de bactéries capables de déclencher des altérations (Lonvaud-Funel, 2001). En contrepartie, quand on se déplace sur la gauche du graphique (pH plus faible), on trouve de moins en moins de populations de bactéries lactiques importantes. Seulement 1/3 des échantillons de la classe 3 a des populations supérieures à 890 UFC/ml et pour la classe 4, 1/8 de ces échantillons est dans ce cas. Toutefois, la classe 4 contient un échantillon "outsider" (en jaune sur le graphique) dont la population est supérieure à 24720 UFC/ml. Cela pourrait s'expliquer par la présence d'une espèce ou souche particulière qui s'est adaptée à ce type de conditions.

La même classification en fonction des paramètres physico-chimiques a été mise en évidence pour les bactéries acétiques. Cette catégorie de micro-organismes est également favorisée par des pH élevés et des TAV faibles.

Les résultats concernant les levures indiquent leur sensibilité à des TAV élevés. En revanche, le SO<sub>2</sub> et le pH ont moins d'effet sur elles que sur les bactéries.

La figure 6 est une nouvelle stratification, en fonction du type de bactéries lactiques, qui montre que les bactéries lactiques du genre *Pediococcus* se trouvent exclusivement dans les vins de pH élevé. L'acidité du vin semble un bon moyen de prévenir la présence de *Pediococcus* et de son risque associé, la maladie de la graisse. En général, *Pediococcus* et *Lactobacillus* se développent rarement dans des vins à pH inférieurs à 3,5 (Davis et al., 1986). L'acidification des vins, par ajout d'acide ou par traitement physique, serait donc un moyen de limiter les altérations dues aux bactéries lac-

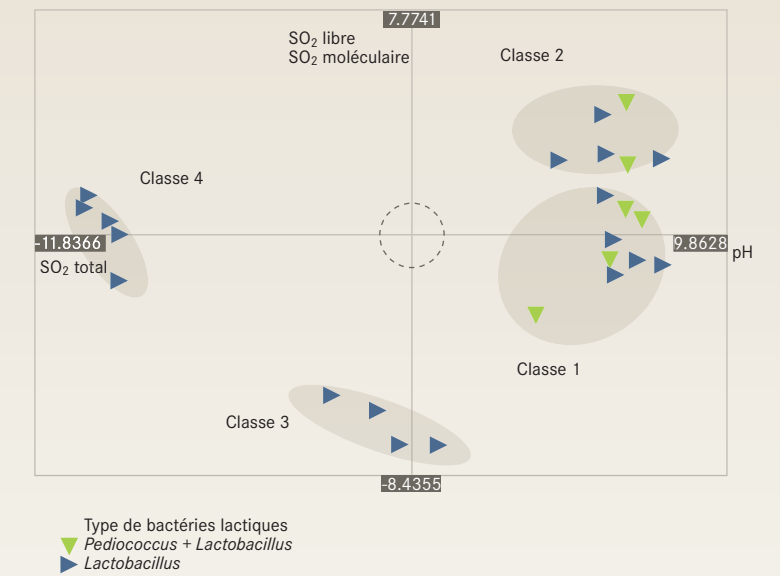


Figure 6 : Stratification des échantillons selon le type de bactéries lactiques (les échantillons ne comportant pas de bactéries lactiques ou comportant des germes autres que *Pediococcus* ou *Lactobacillus* ne figurent plus sur ce graphique).

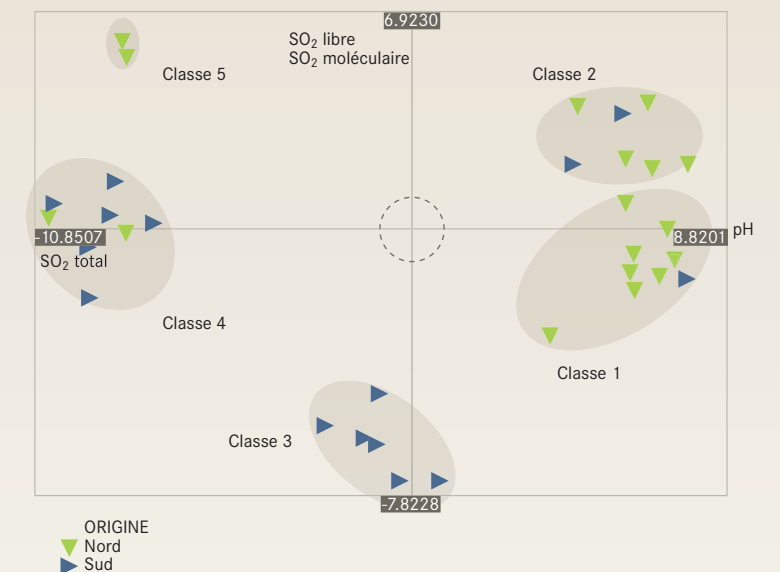


Figure 7 : Stratification des échantillons selon l'origine géographique

tiques. Une identification phénotypique des souches n'a pas mis en évidence la présence d'*Œnococcus oeni*. En effet, la croissance des *Pediococcus* et des *Lactobacillus* serait antagoniste à la survie d'*Œnococcus oeni* (Davis et al., 1986).

Il est intéressant de vérifier si l'origine des vins a une influence sur les populations de micro-organismes. Ainsi, sur la *figure 7*, la stratification est faite selon l'origine des prélèvements. Les vins des Côtes du Rhône

Septentrionales se situent, principalement, dans la partie gauche du graphique, caractérisée, nous l'avons vu précédemment, par des échantillons comportant plus de micro-organismes. Les vins issus de cette région de la Vallée du Rhône seraient plus sujets à des risques d'altérations microbiologiques. De plus, c'est également dans ces vins que l'on rencontre le plus de bactéries du genre *Pediococcus*, qui représentent un véritable risque d'altération.

#### CONCLUSION

L'étude de la flore des vins des Côtes du Rhône en cours d'élevage a permis d'aboutir à plusieurs conclusions sur les micro-organismes du vin. L'interprétation de la présence des populations microbiennes en fonction des caractéristiques œnologiques des vins a été rendue possible par le prélèvement de vins très différents d'un point de vue physico-chimique. Ces résultats restent en concordance avec les connaissances œnologiques, mais ils permettent de valider la méthodologie utilisée.

Pour les vins prélevés en 2003, les micro-organismes les plus nombreux dans les vins en cours d'élevage sont les bactéries lactiques. Les bactéries acétiques sont également présentes à des concentrations non négligeables. Enfin les levures, dont les *Brettanomyces*, restent minoritaires par rapport aux bactéries. Les vins présentant les plus fortes proportions de micro-organismes ont des pH plutôt élevés. En général, ils ont également des taux de SO<sub>2</sub> moléculaires faibles et/ou des TAV faibles. Ces vins, les plus exposés, proviennent majoritairement des Côtes du Rhône Septentrionales. De plus, c'est dans ces vins que l'on retrouve les bactéries lactiques du genre *Pediococcus* qui sont absentes, en revanche, des vins plus acides. Les levures semblent moins sensibles au pH et au SO<sub>2</sub> mais plus à l'alcool. La proportion de vins contaminés par les levures du genre *Brettanomyces* est trop faible pour pouvoir apporter des conclusions et nous allons mener des actions techniques spécifiques de ce germe d'altération.

Les résultats des essais sur le millésime 2002 avaient montré l'absence d'*Œnococcus oeni* durant l'élevage. Cette observation se confirme sur le millésime 2003. La prédominance de *Pediococcus damnosus* constatée en 2002 ne se vérifie pas en 2003. Les pH élevés (de l'ordre de 3,8) semblent favorables au développement de *Pediococcus* en 2003.

Les pH des échantillons contenant *Pediococcus* en 2002 sont plus faibles (de l'ordre de 3,6). Il est donc probable qu'une conjonction de facteurs, dont le pH, favorise *Pediococcus*. Cette étude nous a permis d'avoir une vision ponctuelle de l'écologie microbienne des vins en cours d'élevage. Certains micro-organismes, comme *Pediococcus* et *Brettanomyces* sont bien reconnus comme des germes d'altération, notamment à ce stade de la vie du vin. Il apparaît désormais nécessaire de comprendre plus précisément les besoins physiologiques et les conditions favorables ou non à l'apparition d'altérations provoquées par ces microflores.

#### Remerciements :

Les auteurs souhaitent remercier l'ensemble des sites ayant participé à cette étude. Nous remercions également les financeurs de cette étude, ONIVINS et Région Rhône-alpes, ainsi que Véronique Perrin Rollin du laboratoire œnologique de l'Hermitage (26) et Christophe Garnier de la Chambre d'Agriculture de la Drôme pour les informations fournies.

#### Bibliographie

Davis C. R., Wibowo D. J., Lee T. H., Fleet G. H., 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (3), 539-545.

Lonvaud-Funel A., 2001. Le dioxyde de soufre et les micro-organismes du vin. *Les journées techniques Rhodaniennes, Inter Rhône, mieux raisonner l'utilisation du SO<sub>2</sub>*, 15 juin 2001.

Ribèreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A., 1998. *Traité d'œnologie 1. Microbiologie du vin - Vinifications*, édition Dunod, Paris.