

L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION DU MICROBIOTE LEVURIEN ET BACTERIEN SUR LES VARIETES DE RAISINS DU CENTRE VITICOLE BLAJ-LES VIGNOBLES DE TARNAVE (II^e partie)

IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA MICROBIOTEI LEVURIENE ȘI BACTERIENE LA SOIURILE DE VIȚĂ DE VIE DIN CENTRUL VITICOL BLAJ-PODGORIA TÂRNAVE (PARTEA A II-A)

STAMATE C.¹, ȚÂRDEA C.²

¹Research and Development for Wine Growing and Wine Making Blaj

²University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi

Abstract. *Entre 2001-2005, dans le laboratoire de microbiologie de S.C.D.V.V. Blaj, on a étudié le microbiote qui se développe sur les raisins et qu'on retrouve dans le moût et dans le vin, sur les variétés du centre viticole Blaj-vignoble de Târnave. On a isolé et analysé les souches de levures des classes Deuromycotina et Ascomycotina, les bactéries des genres Leconostoc, Lactobacillus et Acetobacter; au total, 112 souches de levures et 9 bactéries.*

Mots-clés: levures, variétés de raisins, vignobles de Târnave.

Rezumat. *In perioada anilor 2001 – 2005, in cadrul laboratorului de microbiologie de la S.C.D.V.V. Blaj, a fost cercetata microbiota ce se dezvolta pe struguri si care se regaseste in must si vin, la soiurile din centrul viticol Blaj – podgoria Tarnave. Au fost izolate si testate tulpinile de levuri din clasele Deuromycotina si Ascomycotina, bacteriile din genurile Leconostoc, Lactobacillus si Acetobacter. In total 112 tulpini de levuri si 9 bacterii.*

Le microbiote qui se développe sur les raisins durant la période de maturation passe inévitablement dans le moût et le vin. Connaître le microbiote et son évolution dans toutes les étapes technologiques est donc nécessaire, afin de produire des vins de bonne qualité du point de vue biologique.

MATERIEL ET METHODE

Les variétés dont on a fait des prélèvements sont: Feteasca regala, Riesling italien, Sauvignon, Traminer rose et Muscat Ottonel. La méthodologie de travail utilisée pour l'isolement des cellules de levures et des bactéries:

MATERIEL BIOLOGIQUE	SPECIFICATIONS	MOMENT DE L'ISOLEMENT
Grains de raisins	-lavage des grains de raisins à l'eau -distillation: 2-8 minutes	-au début de la maturation -à la maturation complète -à la surmaturation
Moût de raisin	- teneur en sucres 160-170 g/L 180-190 g/L 220 g/L -sulfitage: - moût non-sulfité	-au début de la fermentation -durant la fermentation tumultueuse (alcoolique) -à la fin de la fermentation

	- dose de 50 mg/l - dose de 100 mg/l - dose de 150 mg/l	
Vin nouveau/jeune	- titre alcoométrique 10,5 – 12,5% vol.	-soutirage du vin clarifié du dépôt de fermentation

Isolement des levures. S-au utilizat: metoda dilutiilor succesive (S.Domerg, (1956),

On a utilisé la méthode des dilutions successives (S.Domerg, (1956), la méthode de l'isolement dans la culture pure par la technique de l'épuisement de l'anse, "méthode du pentagone" et "méthode des secteurs".

L'identification des souches de levures a été réalisée par:

-l'examen au microscope de la forme et des dimensions des cellules, après la culture, durant 3 jours

-à 25°C, sur un milieu liquide (moût de raisin stérilisé) et sur un milieu solide (moût de raisin agarisé.

-la formation du pseudomycelium, après la culture de 12 jours sur un milieu de pomme de terre agarisé

-la sporulation sur un milieu synthétique Gorodkova, observations après 30 jours

-on a utilisé le déterminateur réalisé par J.Loder et collab. (1970);

La caractérisation physiologique a été réalisée par les testes:

-la fermentation des sucres

-l'assimilation des sucres et des nitrites

-l'utilisation de l'alcool éthylique comme source de carbone

-la séparation de l'arbutine

Isolement des bactéries (lactiques et acétiques). On a utilisé les mêmes méthodes d'isolation que pour les levures. Les testes d'identification et de caractérisation physiologique:

-les caractères morphologiques (la forme et les dimensions des cellules)

-le caractère homo et hétérofermentatif

-la résistance à l'alcool

-la nature de l'acide lactique formé

-la quantité d'acide acétique formé

-l'assimilation de l'azote ammoniacal

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les souches de levures isolées font partie des classes *Deuromycotina* (tab. 1) et *Ascomycotina* (tab.2).

Tableau 1

Levures isolées de la classe *Deuromycotina* (centre viticole Blaj).

Dont							
Genre et espèce	Nom bre total	%	Par grain s	Moût au début de la fermentation	Moût pendant la fermentation	Moût à la fin de la fermentation	Dans le vin
<i>Candida mycoderma</i>	8	7,14	4	1	1	1	1
<i>Kloeckera apiculata</i>	19	16,96	12	5	1	-	1

<i>Torulopsis stellata</i>	6	5,35	2	3	1	-	-
----------------------------	---	------	---	---	---	---	---

Des données présentées dans le tableau 1, il résulte que de la microflore levurienne spontanée qui appartient à la classe *Deuromycotina* se développant sur les grappes de raisins, les levures apiculées du genre *Kloeckera* (12 souches), suivies par les levures du genre *Candida* (4 souches). Dans le moût en début de fermentation, grâce au sulfitage et au pH du moût, la plupart des levures de la classe *Deuromycotina* sont éliminées. A la fin de la fermentation alcoolique et dans les vins jeunes/nouveaux, on peut rencontrer occasionnellement les levures du genre *Candida* et *Kloeckera*.

Tableau 2

Levures isolées de la classe Ascomycotina (centre viticole Blaj).

Genre et espèce	Total	%	Dont				
			Par grains	Moût au début de la fermentation	Moût pendant la fermentation	Moût à la fin de la fermentation	Dans le vin
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	13	11,6	5	2	1	2	3
<i>Sacch oviformis</i>	12	10,7	1	1	4	4	2
<i>Sacch italiens</i>	8	7,1	2	2	-	3	1
<i>Sacch bayanus</i>	7	6,2	3	1	1	1	-
<i>Sacch cerevisiae</i>	5	4,6	1	1	1	1	1
<i>Sacch chevalierii</i>	5	4,6	1	1	1	1	1
<i>Sacch heterogenieus</i>	4	3,7	1	1	1	-	1
<i>Sacch baillii</i>	3	2,7	-	2	1	-	-
<i>Sacch carlsbergensis</i>	3	2,7	-	1	-	2	-
<i>Sacch kluyveri</i>	3	2,7	2	1	-	-	-
<i>Sacch rouxii</i>	3	2,7	-	1	1	1	-
<i>Sacch uvarum</i>	2	1,8	-	2	-	-	-
<i>Sacch florentinus</i>	2	1,8	1	1	-	-	-
<i>Sacch enspagieus</i>	2	1,8	1	-	-	-	1
TOTAL GENERAL Saccharomycetes	72	64,2	18	17	11	15	10
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	1	0,9	1	-	-	-	-

<i>Pichia membranifaciens</i>	2	1,8	2	-	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	2	1,8	1	1	-	-	-
<i>Hansenula ciferii</i>	1	0,9	1	-	-	-	-
<i>Dekkera bruxellensi</i>	1	0,9	-	-	-	1	-

Des données présentées dans le tableau 2, il résulte que le microbiote levurien de la classe *Ascomycotina* domine sur les grappes de raisins, dans le moût et dans le vin. On a une dominance des levures du genre *Saccharomyces* 64,2 %. Par espèce, la situation est la suivante: 13 espèces de *Sacch. ellipsoideus*, 12 de *Sacch. oviformis*, 8 de *Sacch. italians*, 7 de *Sacch. bayanus*, 5 de *Sacch. cerevisiae*, 5 de *Sacch. chevalierii*, 4 de *Sacch. heterogenieus*, 3 de *Sacch. bailii*, 3 de *Sacch. carlsbergers*, 3 de *Sacch. khuyveri*, 3 de *Sacch. rauxii* et 2 espèces de *Sacch. uvarum*, *florentinus* si *eupagieus*.

D'autres espèces de levures: 2 de *Pichia membranifaciens*, 2 de *Hansenula anomala* et une des espèces *Dekkera bruxelensis*, *Hansenula ciferii* si *Khuyveromices bulgaricus*.

L'isolement des bactéries. Les souches de bactéries qui ont été isolées des grappes et du moût sont:

Dont				
Genre et espèce	Total	%	Par grains	Moût au début de la fermentation
<i>Lactobacillus</i>	4	40	3	1
<i>Leuconostoc</i>	3	30	2	1
<i>Acetobacter</i>	2	20	2	-

On enregistre une dominance des bactéries lactiques des genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, tant sur les grappes que dans le moût. Les bactéries acétiques sont présentes uniquement sur les grappes et n'apparaissent pas dans le moût, en début de fermentation.

Répartition du microbiote par cépage: (tableau 3).

Celle-ci enregistre des différences importantes, selon le degré de maturation des raisins et de leur composition chimique (accumulation de sucres et acidité totale).

Tableau 3

Situation du microbiote par variété

Variété	Levures		Bactéries:	
	Espèce	Nombre	Genre	Nombre
FETEASCA REGALA	<i>Sacch. oviformis</i>	6	<i>Leuconostoc</i>	3
	<i>Kloeckera apiculata</i>	5	<i>Acetobacter</i>	2
	<i>Candida mycoderma</i>	3		
	<i>Sacch. italicus</i>	3		
	<i>Sacch. bayanus</i>	2		
	<i>Sacch. heterogenicus</i>	2		
	<i>Sacch. bailii</i>	1		
	<i>Sacch. carlsbergers</i>	1		

	<i>Sacch ellipsoideus</i>	1		
	<i>Sacch cerevisiae</i>	1		
	<i>Sacch chevalieri</i>	1		
	<i>Hansenula ciferii</i>	1		
	<i>Kluytomyces</i>			
	<i>Bulgariensis</i>	1		
Total	Souches de levures	28	Bactéries	5
RIESLING ITALIEN	<i>Kloeckera apiculata</i>	5	<i>Lactobacillus</i>	3
	<i>Torulopsis stelata</i>	4		
	<i>Candida mycoderma</i>	2		
	<i>Pichia membranifaciens</i>	2		
	<i>Scch bayanus</i>	2		
	<i>Scch ellipsoideus</i>	2		
	<i>Sacch uvarum</i>	2		
	<i>Sacch italicus</i>	2		
	<i>Sacch florentinus</i>	2		
	<i>Sacch bailii</i>	1		
	<i>Sacch cerevisiae</i>	1		
	<i>Sacch chevalieri</i>	1		
Total	Souches de levures	26	Bactéries	3
SAUVIGNON	<i>Sacch ellipsoideus</i>	4		
	<i>Sacch rouxii</i>	3		
	<i>Sacch Kluyveri</i>	3		
	<i>Sacch chevalieri</i>	2		
	<i>KLaechera apiculata</i>	2		
	<i>Dekkera Bruxelensis</i>	1		
	<i>Sacch carlsbergers</i>	1		
	<i>Torulopsis stelata</i>	1		
Total	Souches de levures	17	-	-
TRAMINER ROSE	<i>Sacch ellipsoideus</i>	4	<i>Lactobacillus</i>	1
	<i>Sacch oviformis</i>	4		
	<i>Sacch bayanus</i>	3		
	<i>Sacch italicus</i>	3		
	<i>Candida mycoderms</i>	3		
	<i>Kloeckera apiculata</i>	2		
	<i>Hansenula anomala</i>	2		
	<i>Sacch eupagieus</i>	2		
	<i>Sacch bailii</i>	1		
	<i>Sacch cerevisiae</i>	1		
	<i>Sacch chevalieri</i>	1		
	<i>Torulopsis stelata</i>	1		
Total	Souches de levures	27	Bactéries	1
MUSCAT OTTONEL	<i>Kloeckera apiculata</i>	5	-	-
	<i>Sacch oviformis</i>	2		
	<i>Sacch cerevisiae</i>	2		
	<i>Sacch ellipsoideus</i>	2		
	<i>Sacch heterogeni</i>	2		
	<i>Sacch carlsbergers</i>	1		
Total	Souches de levures	14	-	-

Des données présentées dans le tableau 3, on observe l'existence d'un microbiote riche sur les grains et dans le moût des cépages Feteasca regala,

Traminer rose si Riesling italien: 28 – 26 souches et 3-5 bactéries des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Acetobacter*.

Un microbiote moins significatif est enregistré pour les variétés Sauvignon (17 souches de levures) et Muscat Ottonel (14 souches de levures).

Dans la fig.1, on présente l'évolution des espèces de levures sur les grappes, dans le moût durant la fermentation alcoolique et dans le vin.

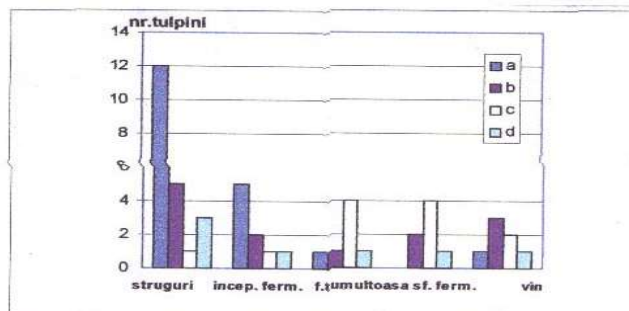


Fig.1. Evolution des espèces de levures sur les grappes, dans le moût et le vin:

- a) Levures de l'espèce *Kloeckera apiculata*;
- b) Levures de l'espèce *Saccharomyces*, varietatea *ellipsoideus*;
- c) Levures de l'espèce *Saccharomyces oviformis*;
- d) Levures de l'espèce *Saccharomyces bayanus*.

CONCLUSIONS GENERALES

1. Le microbiote spécifique qui se développe sur les raisins des cépages du centre viticole Blaj-vignoble de Târnave est dominé par les levures du genre *Saccharomyces* (72%), suivies par celles des genres *Kloeckera* (16,96 %), *Candida/Dekkera* (7,14%) et *Torulopsis* (5,35%).

2. Les bactéries qui constituent le microbiote des raisins et du moût appartiennent aux genres *Lactobacillus* (70%), *Leuconostoc* (30%) et *Acetobacter* (20%).

3. Le microbiote le plus riche sur les grappes est rensontrée pour les variétés: Feteasca regala (28 souches de levures), Traminer rose (23 souches) et Riesling Italien (26 souches).

BIBLIOGRAPHIE

1. Danoaie F., 1997 - *Lucrarile Simpozionului Stiintific "Debates Horticultura Clujeana"*
2. Domera S., 1956 - *Etude et classification des levures de vin de la Gironde*, These Ingineur Docteur, Univ.Bordeaux.
3. Loder J., NJH Kreger van Rij, 1967 - *A Taxonomic Study*, 2nd edition , North Holland Publishing Company, Amsterdam.
4. Sandu Ville G., 1975 - *Contributii la studiul clasificarea drojdiilor de vin din microbiota vinicola a podgoriei Copou-Iasi*, "Teza de doctorat" Institutul Agronomic Iasi.
5. Stamate C., Tardea C., 2006 - *Lucrari stiintifice USAMV Iasi, sectia de Horticultura*, vol.49,pag.537-542.
6. Tardea C., Gh.Sarbu, Tardea Angela, 2000 - *Tratat de vinificatie*, Ed."Ion Ionescu de la Brad" Iasi.