

Microbiologie des vins

Mise en place et résultats d'un essai interlaboratoires

Caterina Mazzoni, Abdelkader Boubetra, Sandrine Nguyen, Anne Tirard
Bipea - Paris - France.

Introduction

Le vin est une matrice complexe tant sur le plan physico-chimique que sur le plan microbiologique. De nombreux micro-organismes, technologiques ou d'altération, peuvent coexister et former un écosystème microbien difficile à appréhender. L'objectif de l'analyse microbiologique des moûts et des vins est d'assurer une meilleure qualité des vins, en permettant de détecter toute anomalie pendant les différentes phases de la fabrication et dans le produit fini.

Les méthodes développées pour la détection et la quantification des micro-organismes dans le vin peuvent être groupées en trois catégories principales: techniques de microscopie (cellule de Malassez, épifluorescence), dénombrement des micro-organismes par culture (comptage sur boîte de Pétri) et PCR (Polymerase Chain Reaction), technique basée sur l'identification des micro-organismes à partir de leur ADN, notamment utilisée pour la détermination des *Brettanomyces*.

Le nombre de laboratoires pratiquant le contrôle microbiologique des vins a augmenté ces dernières années, néanmoins, l'absence d'essai interlaboratoires dans ce domaine présente un écueil pour les laboratoires dans le cadre de l'assurance qualité pour le contrôle de leur performance.

Cet article décrit la conception et la réalisation d'un essai d'aptitude mettant en œuvre des échantillons de vin dopés en levures. L'objectif de ce circuit expérimental est de permettre aux laboratoires de démontrer la fiabilité de leurs résultats et de comparer les données analytiques et les protocoles appliqués pour le dénombrement des *Brettanomyces* dans les vins.

Méthodologie

Un essai d'aptitude implique l'analyse par chaque laboratoire d'un même échantillon pour la détermination de critères analytiques donnés. D'une façon générale, la conception d'un essai d'aptitude peut être résumée en trois étapes principales: la préparation des entités soumises à l'essai, l'analyse des échantillons par les laboratoires et le traitement statistique des données, avec l'estimation d'une valeur assignée.

Préparation des échantillons

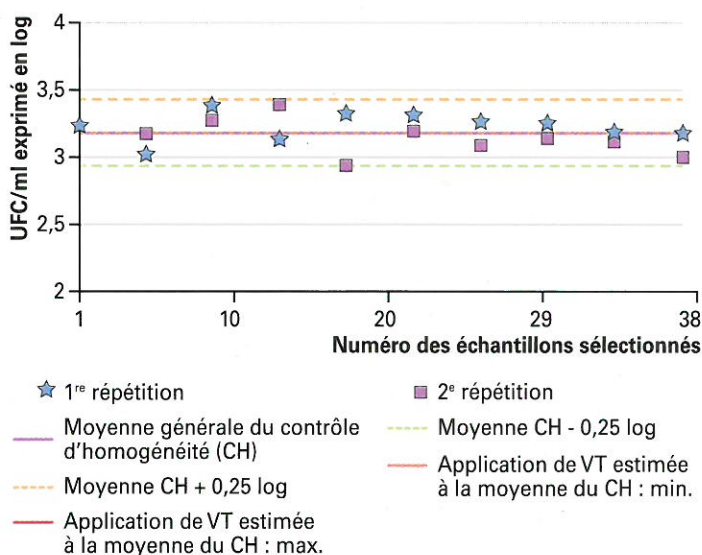
Un des points fondamentaux lors de l'organisation d'un essai d'aptitude est la préparation des échantillons. Ces derniers doivent être suffisamment homogènes et stables pour éviter d'imputer des écarts liés aux échantillons comme des écarts de justesse liés aux laboratoires. Les échantillons ont été préparés par dopage d'un vin rouge (1)

(1) 100 % Grenache, Côtes-du-Rhône, SO₂ total 1 mg/l.

■ **Tableau 1: Résultats moyens des dénombrements des *Brettanomyces* dans le vin après 7 jours de conservation à (5±3) °C.**

Jour d'analyse	J 0	J 1	J 3	J 4	J 7
Moyenne (UFC/ml, en log)	2,781	2,405	2,723	2,825	2,463

■ **Figure 1: Résultats du contrôle d'homogénéité des échantillons en fonction de leur numéro de fabrication.**



avec une suspension de *Dekkera bruxellensis* (2) ajustée en termes de nombre de micro-organismes.

La stabilité du produit a été évaluée sur une durée de sept jours sur trois échantillons analysés en double (deux répétitions). L'homogénéité des échantillons préparés a été vérifiée par une étude sur dix échantillons (deux répétitions) prélevés au sein d'une fabrication de 38 échantillons, selon un pas défini. Les analyses ont été effectuées selon le protocole défini dans le recueil OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin).

Analyse des échantillons par les laboratoires

Les échantillons ont été envoyés aux 20 laboratoires participant à l'essai, accompagnés d'un formulaire de réponse. Ces échantillons ont été expédiés en colis réfrigéré avec un échantillon d'eau pour témoin de température.

(2) Souche BM010, pour le critère analytique *Brettanomyces*.

Les participants ont été invités à saisir dans le formulaire de réponse, en plus de la concentration en micro-organismes (en unité formant colonie par millilitre, UFC/ml), des informations sur la date de mise en analyse, la méthode utilisée, le milieu de culture, la température, le temps d'incubation et le type d'ensemencement. Compte tenu de la nature instable des échantillons, ils ont dû prendre en charge les échantillons dès leur réception.

Traitement statistique des données et résultats de l'essai

Le traitement statistique des résultats a été réalisé selon la norme ISO 13528 « Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires ». Une valeur assignée a été estimée à partir de la moyenne issue de l'application de l'algorithme robuste A. Pour porter un jugement sur l'aptitude des laboratoires, une valeur de tolérance (deux fois l'écart type issu de l'application de l'algorithme robuste A) a été calculée. Cette valeur sert à déterminer un intervalle autour de la valeur assignée. Les résultats en dehors de cet intervalle ont été considérés comme non justes.

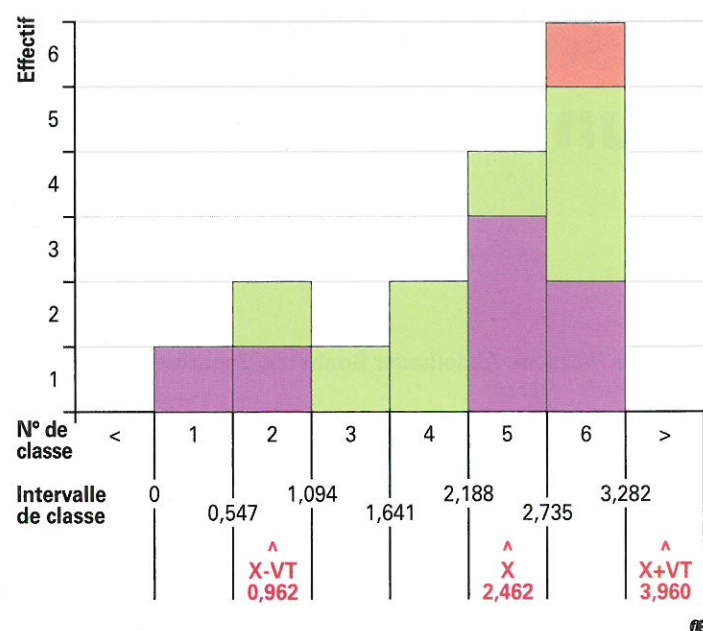
Résultats

Les résultats des études de stabilité des échantillons montrent un taux de recouvrement satisfaisant par rapport aux concentrations ciblées après sept jours de conservation des échantillons à (5±3) °C (tableau 1).

Les résultats des analyses d'homogénéité sont résumés graphiquement dans la figure 1. Ces données montrent une homogénéité satisfaisante des échantillons avec une étendue entre les valeurs minimum et maximum de 0,460 UFC/ml en log. Seize laboratoires sur vingt ont rendu leurs résultats accompagnés d'informations intéressantes pour le traitement des données.

Une valeur assignée de 2,462 UFC/ml (exprimé en log) a été estimée à partir de la moyenne robuste des résultats de tous

■ **Figure 2: Résultats de l'essai d'aptitude sous forme d'histogramme.**



les laboratoires, à l'exception des résultats obtenus hors délai d'analyse et du résultat obtenu par PCR, le principe de cette méthode étant différent par rapport aux autres (méthodes culturales). Les principaux paramètres statistiques calculés à partir des données de l'essai sont résumés dans le tableau 2.

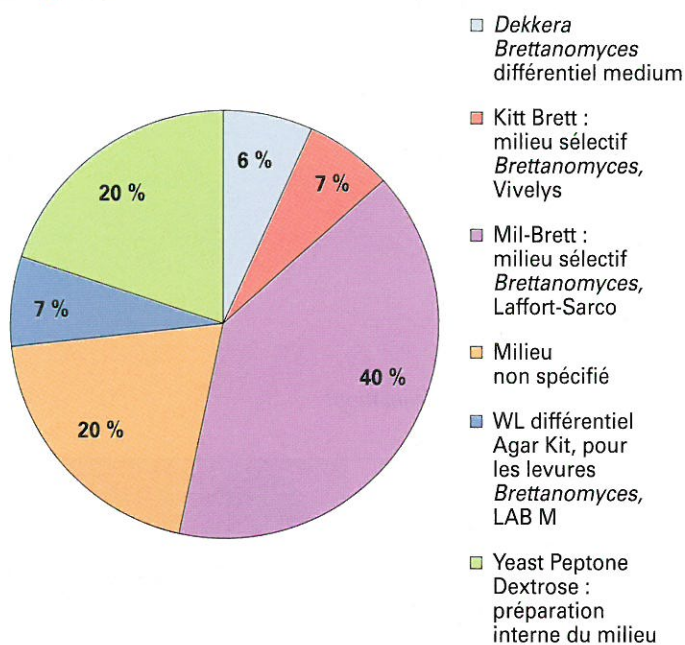
Les données des laboratoires ont été compilées sous forme

d'histogramme (figure 2); la valeur assignée et l'intervalle de tolérance de l'essai sont indiqués sur l'axe des abscisses. La répartition des laboratoires sur ce graphique a été effectuée en fonction de la méthode appliquée: OIV (8 laboratoires, en vert), interne (7 laboratoires, en bleu) et PCR (1 laboratoire, en orange). Les moyennes par méthode sont résumées ci-après (tableau 3).

■ **Tableau 2: Synthèse des résultats du traitement statistique des données.**

Paramètre statistique	Valeur
Valeur assignée pour l'évaluation de l'aptitude (X)	2,462, UFC/ml en log
Incertitude-type sur la valeur assignée (u_x) ^a	0,270, UFC/ml en log
Écart-type robuste des résultats (s_x^*), calculé sur l'ensemble des résultats ayant participé à l'estimation de la valeur assignée	0,749, UFC/ml en log
Nombre de résultats ayant participé à l'estimation de la valeur assignée (p_x)	12
Coefficient de variation (CV_x)	30 %
Écart-type pour l'évaluation de l'aptitude (SDPA), caractéristique de dispersion reliée à l'évaluation des résultats	0,749, UFC/ml en log
Valeur de tolérance, 2 écarts-types pour l'évaluation de l'aptitude. Elle correspond à un écart maximum toléré par rapport à la valeur assignée ($VT = 2 \times SDPA$)	1,498, UFC/ml en log
Borne supérieure de l'intervalle de tolérance (valeur assignée + valeur de tolérance). Valeur au-dessus de laquelle le résultat est considéré non juste ($X + 2 \times SDPA$)	3,960, UFC/ml en log
Borne inférieure de l'intervalle de tolérance (valeur assignée - valeur de tolérance). Valeur en dessous de laquelle le résultat est considéré non juste ($X - 2 \times SDPA$)	0,964, UFC/ml en log
Résultats non justes (p_b)	2

■ **Figure 3: Milieux de culture utilisés par les laboratoires.**



Des milieux de culture provenant de différents fournisseurs ont été utilisés (la répartition des milieux utilisés est décrite en **figure 3**). Le milieu de culture le plus utilisé est le « Mil-Brett: milieu sélectif *Brettanomyces* »

de Laffort-Sarco. La température et le temps d'incubation donnés par les différents laboratoires varient respectivement de 25 °C à 30 °C et de 5 à 12 jours. La majorité des participants a appliqué la méthode

■ **Tableau 3: Moyennes par méthode (UFC/ml, en log).**

	Toutes méthodes	Méthode OIV	Méthodes internes	PCR
Moyennes, x^*_m	2,462	2,182	2,060	2,916
Incertitude-type sur la moyenne, $u_{x^*_m}$	0,270	0,397	0,680	-
Écart-type robuste des résultats, s^*_m	0,749	0,898	1,438	-
Nombre de résultats pris en compte, p_m	12	8	7	1

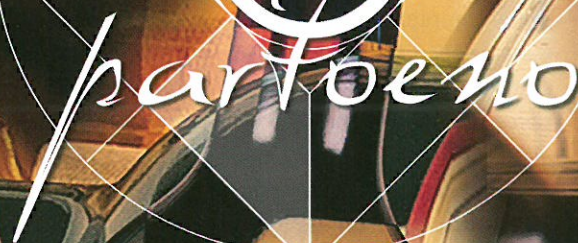
d'ensemencement en surface. Aucune tendance n'a été mise en évidence en fonction de la méthode, du milieu utilisé ou des conditions d'incubation.

Conclusion

L'essai interlaboratoires pour le critère analytique *Brettanomyces* dans le vin, regroupant une vingtaine de laboratoires dans le monde, a été mis en place avec succès et les résultats ont été diffusés aux participants. Ce circuit expérimental a été transformé en circuit classique avec trois essais par an. Les laboratoires ont désormais un moyen de contrôler de manière ponctuelle, mais aussi continue dans le temps, la fiabilité de leurs résultats et de faire reconnaître leurs procédures analytiques par les organismes d'accréditation compétents.

La Maîtrise du Végétal

Le spécialiste de l'extraction élaborée pour les Vins



www.partoeno.com