

# Impiego dell'ozono contro i contaminanti microbici del vino: esperienze in cantina

Prof.ssa Sandra Torriani

*Dipartimento di Biotecnologie  
dell'Università degli Studi di Verona*



**Enoforum2015**  
INNOVAZIONE ED ECCELLENZA

Vicenza, 5-7 maggio



# Qualità e Igiene

La qualità sensoriale e igienico-sanitaria di un prodotto alimentare dipende dall'applicazione di scrupolose pratiche igieniche nei locali e nelle attrezzature volte a minimizzare le contaminazioni.

Il vino, per natura, è un alimento microbiologicamente sicuro:

- acidità elevata;
- etanolo;
- ...

Tuttavia, possibili rischi per il consumatore derivano da metaboliti prodotti da muffe e batteri:

- micotossine;
- ammine biogene.

La sanità delle uve e l'igiene della cantina aiutano a prevenire questi problemi.



# L'igiene in cantina: prevenire le alterazioni

La sanificazione dei locali e delle attrezzature in cui è prodotto e conservato il vino, è utile anche per prevenire le alterazioni (malattie) del vino:

- elevata acidità volatile;
- etilfenoli;
- agrodolce;
- filante;
- ...

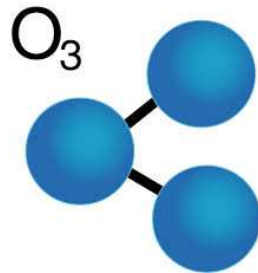


# Stato dell'arte dell'uso dell'ozono (O<sub>3</sub>) in enologia

L'ozono rappresenta una valida alternativa agli approcci tradizionali impiegati in enologia per il controllo microbico delle superfici *in-situ*.

L'ozono è caratterizzato dal fatto che non lascia residui e da uno spettro d'azione antimicrobico universale, dimostrando di essere attivo contro tutte le forme microbiologiche di interesse (Khadre *et al.*, 2001):

- batteri;
- lieviti;
- muffe;
- spore;
- virus.



# Esperienze dell'applicazione dell'O<sub>3</sub> in cantina

É stato applicato un protocollo di sanitizzazione dei contenitori in legno impiegando **ozono in forma gassosa** prodotto *in-situ*.

20 cantine ubicate in 6 regioni italiane

Determinazione del numero di **microrganismi SSO** (*Specific Spoilage Organisms*) prima e dopo il trattamento, in substrati elettivi:

- WL: miceti (lieviti e muffe);
  - MRS: batteri lattici;
  - GYC: batteri acetici.
  - DBDM: *Dekkera/Brettanomyces*
- (Rodrigues *et al.*, 2001)



# Verifica dell'igiene in cantina – lavori in corso...

OIV ha codificato i protocolli per le analisi dei mosti e dei vini,

ma si inizia a sentire la necessità di:

- metodi di campionamento;
- mezzi di coltura dedicati;

anche per valutare

contaminazioni ambientali

## SECTION 4 – MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

- |  |                |
|--|----------------|
| - Microbiological Analysis (Oeno 206-2010)   | OIV-MA-AS4-01  |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (Fermentability Test) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009)  | OIV-MA-AS4-02A |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (Detection of the following acids: sorbic, benzoic, <i>p</i> -chlorobenzoic, salicylic, <i>p</i> -hydroxybenzoic and its esters) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009) | OIV-MA-AS4-02B |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (Detection of the monohalogen derivatives of acetic acid) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009)  | OIV-MA-AS4-02C |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (determination of ethyl pyrocarbonate) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009)   | OIV-MA-AS4-02D |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (Examination of dehydroacetic acid) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009)  | OIV-MA-AS4-02E |
| - Detection of preservatives and fermentation inhibitors (Sodium Azide by HPLC) (A35; Oeno 6/2006 revised by 377/2009)   | OIV-MA-AS4-02F |
| - Enumerating yeasts of the species <i>Brettanomyces bruxellensis</i> using qPCR (Oeno 414-2011)   | OIV-MA-AS4-03  |

Method OIV-MA-AS4-01

Type IV Method

### Microbiological Analysis of Wines and Musts

#### Detection, Differentiation and Counting of Micro-organisms

(Resolution OIV-Oeno 206/2010)

#### Field of application:

Microbiological analysis can be applied to wines, musts, mistelles and all similar products even when they have been changed by bacterial activity. These methods may also be used in the analysis of industrial preparations of selected microorganisms, such as drv active yeasts and lactic bacteria.

# Esperienze in cantina : protocollo di sanitizzazione – botti

Svuotare la botte dal vino

Effettuare 3-5 campionamenti con tamponi sterili (T0)

Trattamento con  $O_3$  gassoso

Effettuare 3-5 campionamenti con tamponi sterili (T1)

Analisi microbiologiche



# Esperienze in cantina : protocollo di sanitizzazione – *barriques / tonneaux*

Svuotare

Lavare con acqua calda (60 C° per 10 min)

Riempire il contenitore con 12 L H<sub>2</sub>O

Girare il contenitore\*

Prelevare campioni di acqua (T0)

Trattamento con O<sub>3</sub> gassoso

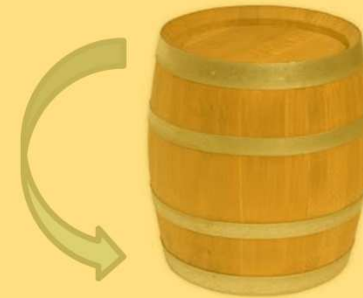
Riempire il contenitore con 12 L H<sub>2</sub>O

Girare il contenitore\*

Prelevare campioni di acqua (T1)

Analisi microbiologiche

\*



Girare su un fondo per **2 min**

Girare sul secondo fondo per **2 min**

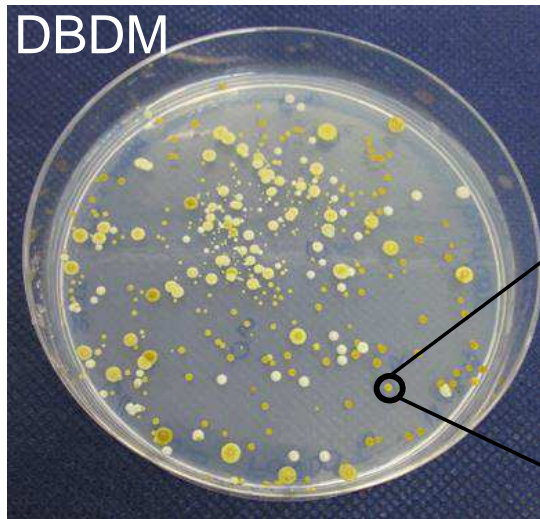
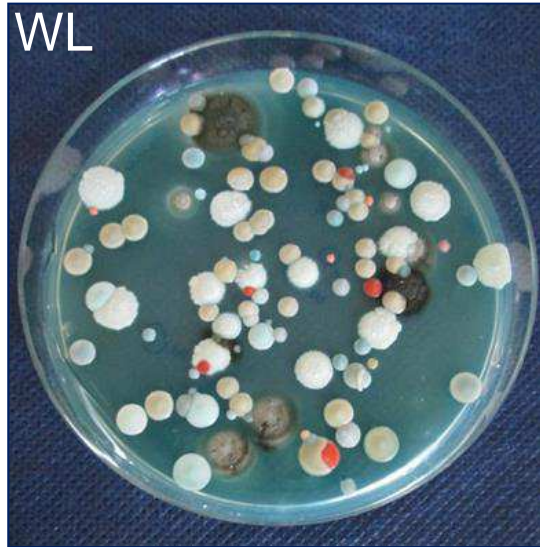
Girare sul secondo fondo per **2 min**

**5 giri** a destra e **5 giri** a sinistra, sulla pancia



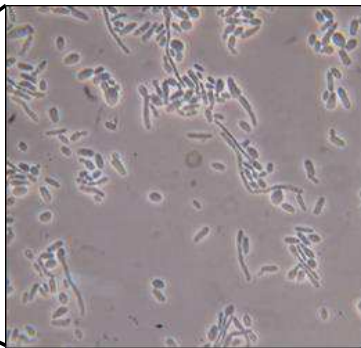


# Risultati: il microbiota dei legni, i lieviti



I **campioni T0** mostrano eterogeneità nella popolazione. I risultati confermano sostanzialmente i dati di letteratura:

- *Candida* spp.
- *Pichia* spp.
- *Aureobasidium pullulans*;
- *Rhodotorula* spp.
- *Cryptococcus* spp.
- *Saccharomyces* spp.
- *Dekkera/Bruxellensis*  
(minoritario, possibile per limiti del metodo colturale)



## Osservazione:

In alcuni casi i tamponi evidenziano una contaminazione disomogenea nelle botti

# Risultati: il microbiota dei legni, i lieviti

Tipo di campione (tamponi/lavaggi)

e cariche iniziali (T0)

molto eterogenee

(0 –  $1 \cdot 10^5$  UFC /ml),

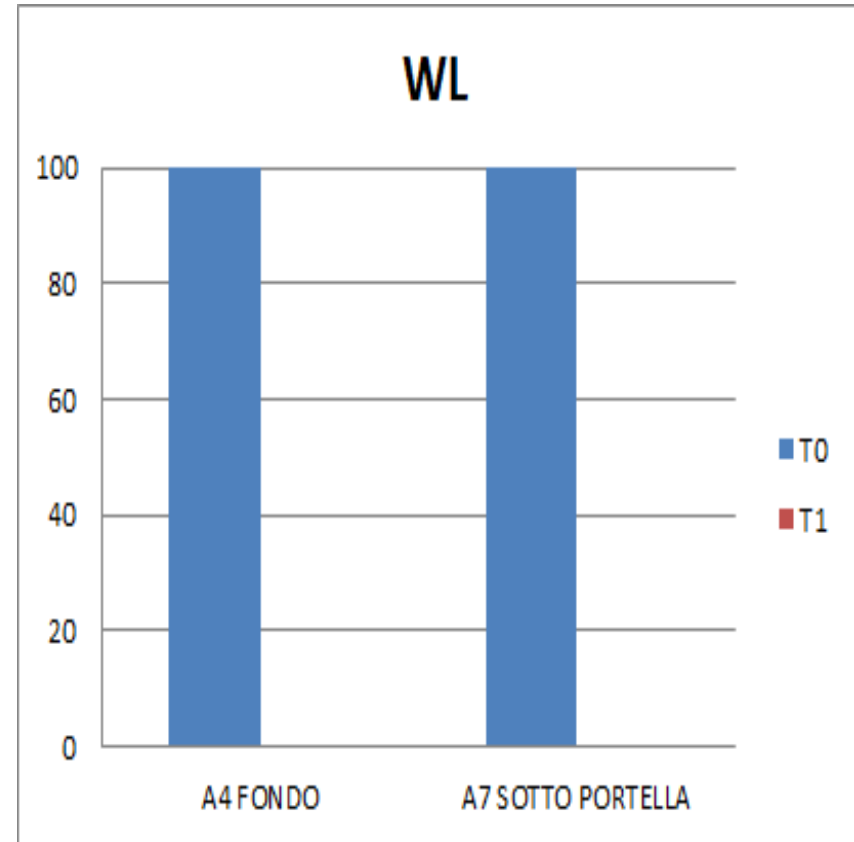
**Dopo il trattamento con O3**

nel 97% dei casi

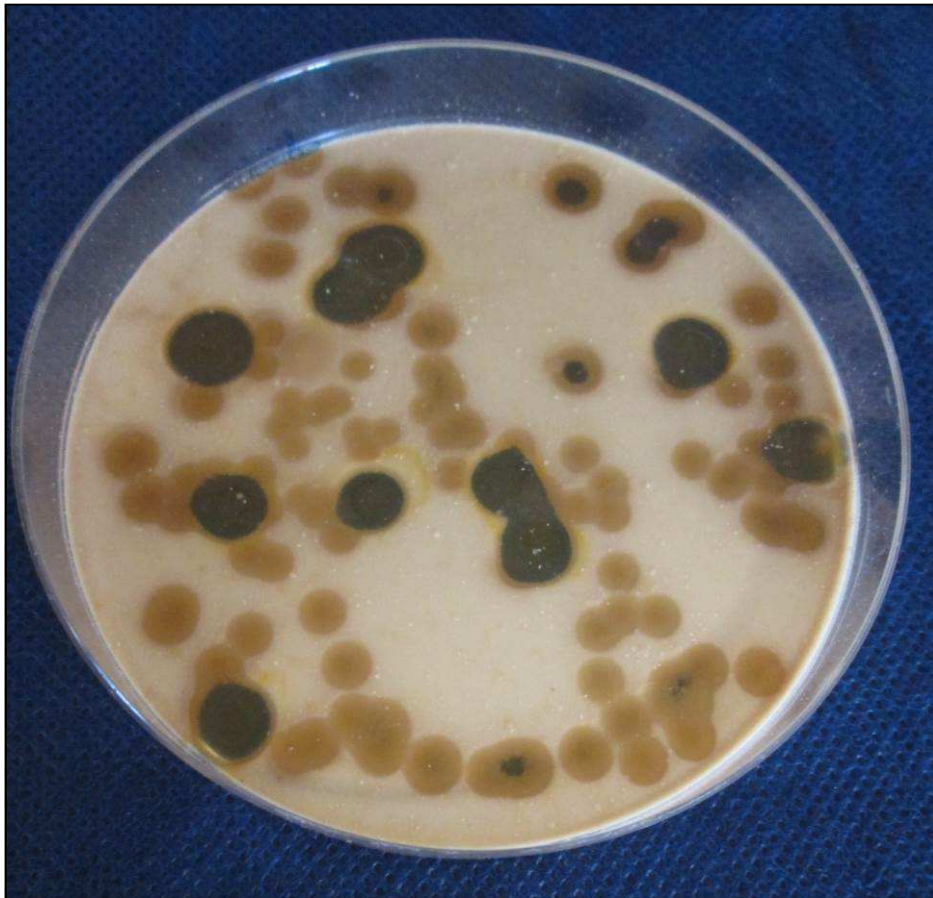
si raggiunge obiettivo:

tra T0 e T1 si osserva

**abbattimento tra 90 e 100%.**



# Risultati: il microbiota dei legni, i batteri acetici



## GYC

(50 g/l glucosio, 10 g/l estratto di lievito, 30 g/l  $\text{CaCO}_3$  che funge da indicatore)

Consente lo sviluppo anche dei BA non adattati alla presenza di etanolo ma comunque di interesse enologico

(*Acetobacter* spp.,

*Gluconobacter* spp.,

*Gluconacetobacter* spp. e

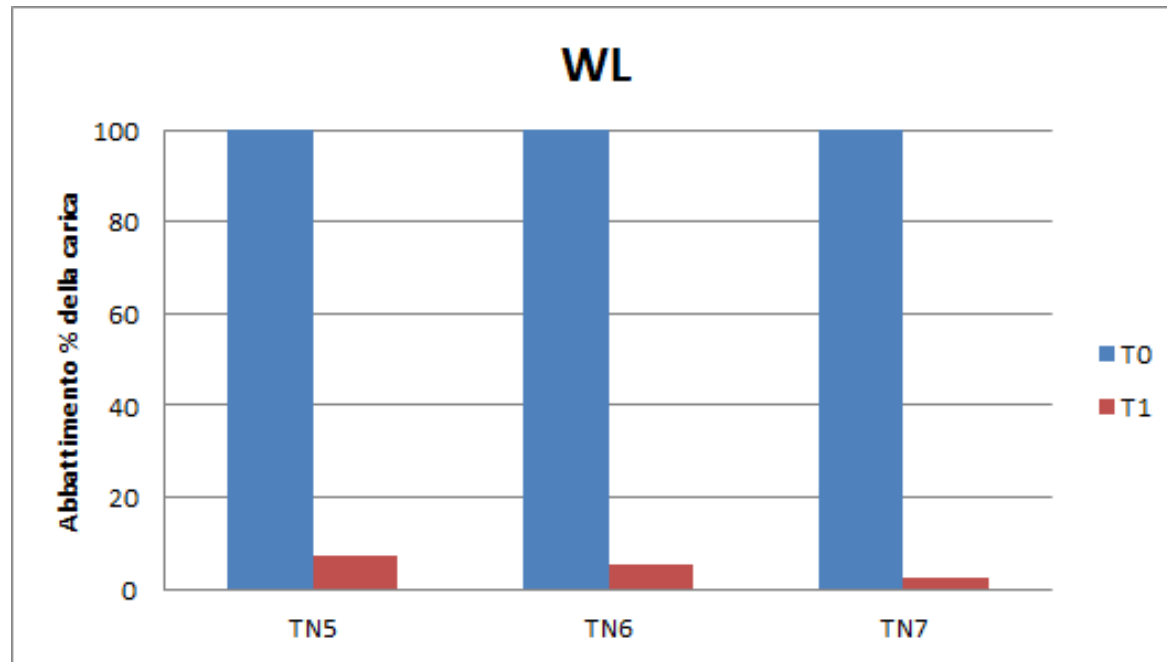
*Komagataeibacter* spp.)

Tipo di campione (tamponi/lavaggi) e cariche iniziali molto eterogenee

(**0 –  $1 \cdot 10^6$  UFC /ml**), ma nel 90% dei casi si raggiunge obiettivo:

tra T0 e T1 si osserva **abbattimento tra 90 e 100% // casi di incremento**

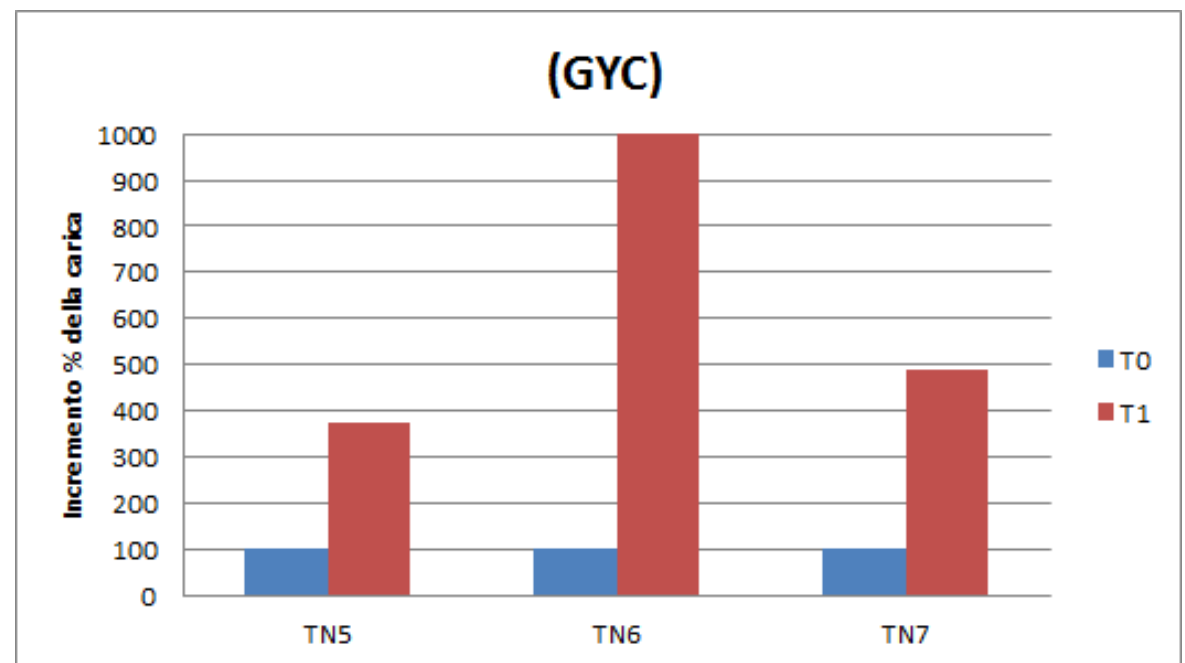
# Caso studio cantina B (*tonneaux*): un trattamento



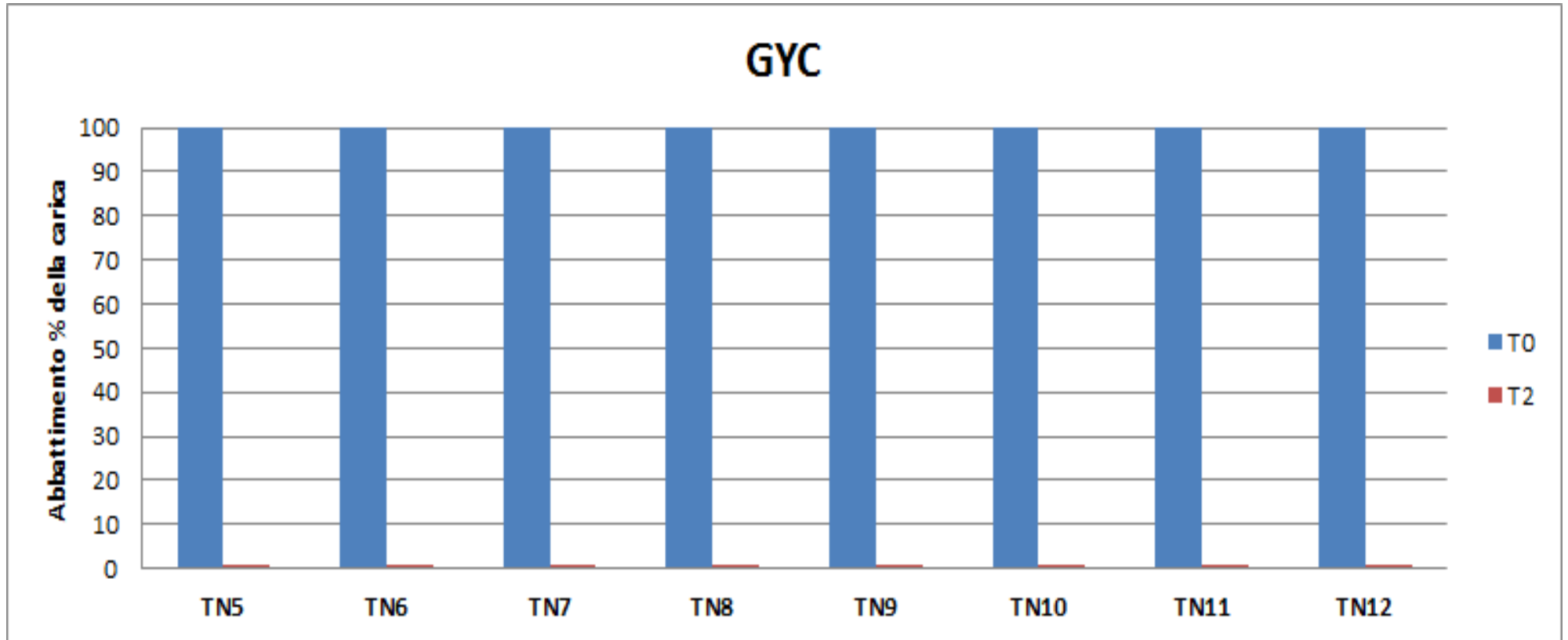
Miceti (lieviti e muffe)

$10^5 - 10^6$  UFC /ml

Batteri acetici  
 $10^3 - 10^5$  UFC /ml

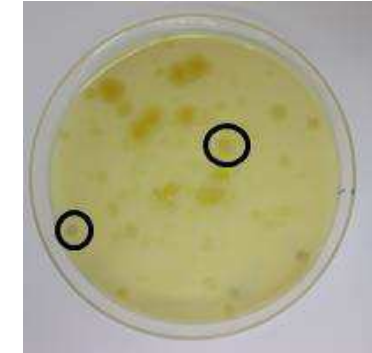
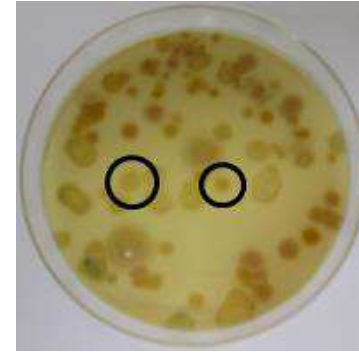
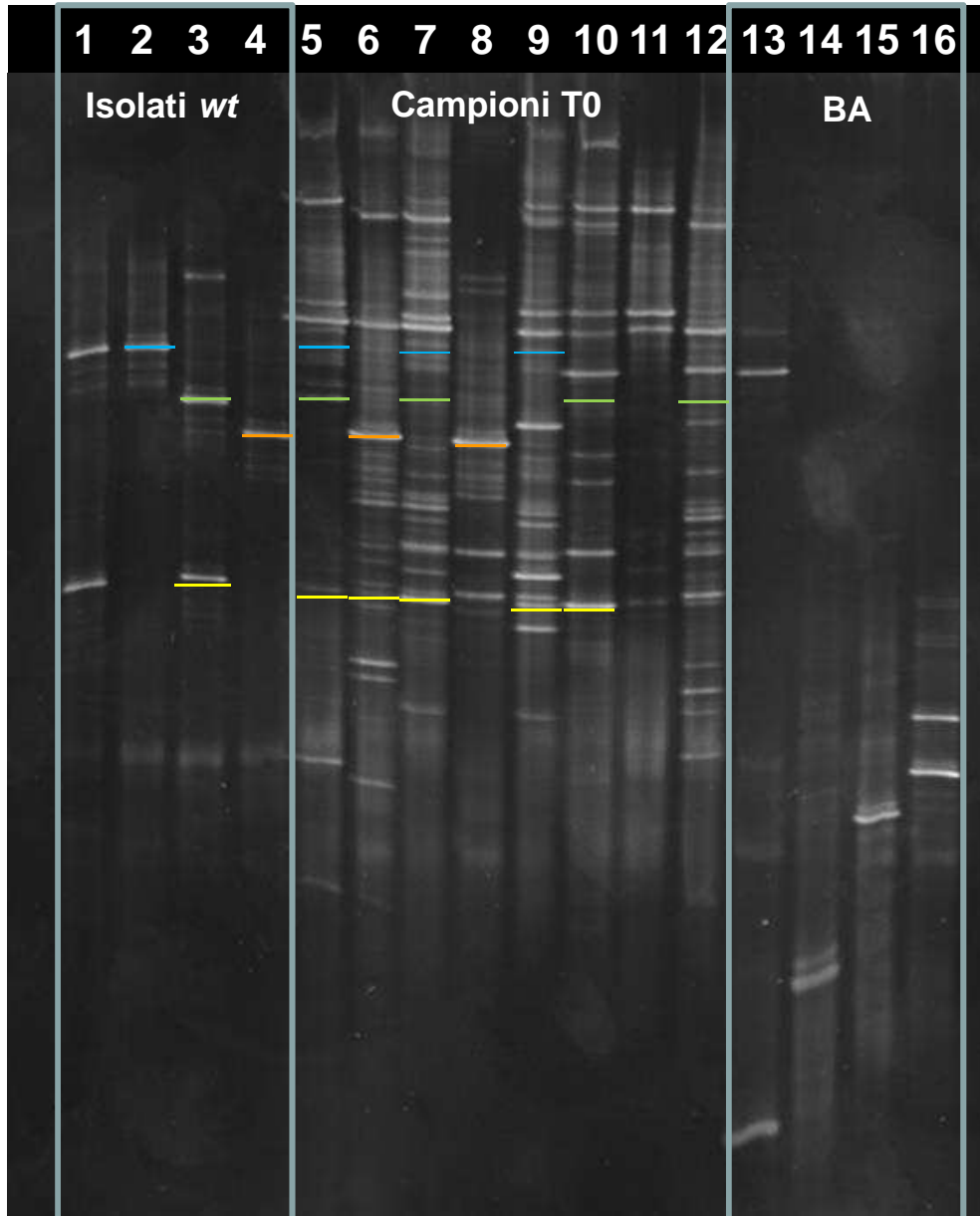


# Caso studio cantina B (*tonneaux*): due trattamenti



Tra T0 e T1 si osserva **abbattimento del 100%**

# Analisi coltura-indipendente : PCR-DGGE con *primer* universali HDA1-HDA2



1 - 4) quattro isolati *wt* da GYC sono stati impiegati come *ladder*

5 -12) campioni T0 da *tonneaux*

13) *Acetobacter aceti*

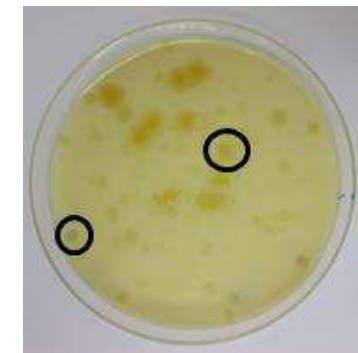
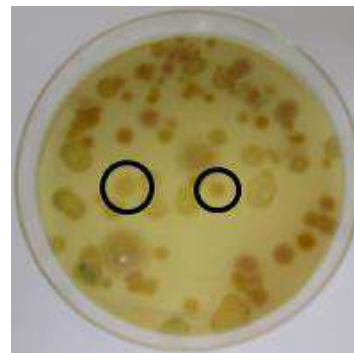
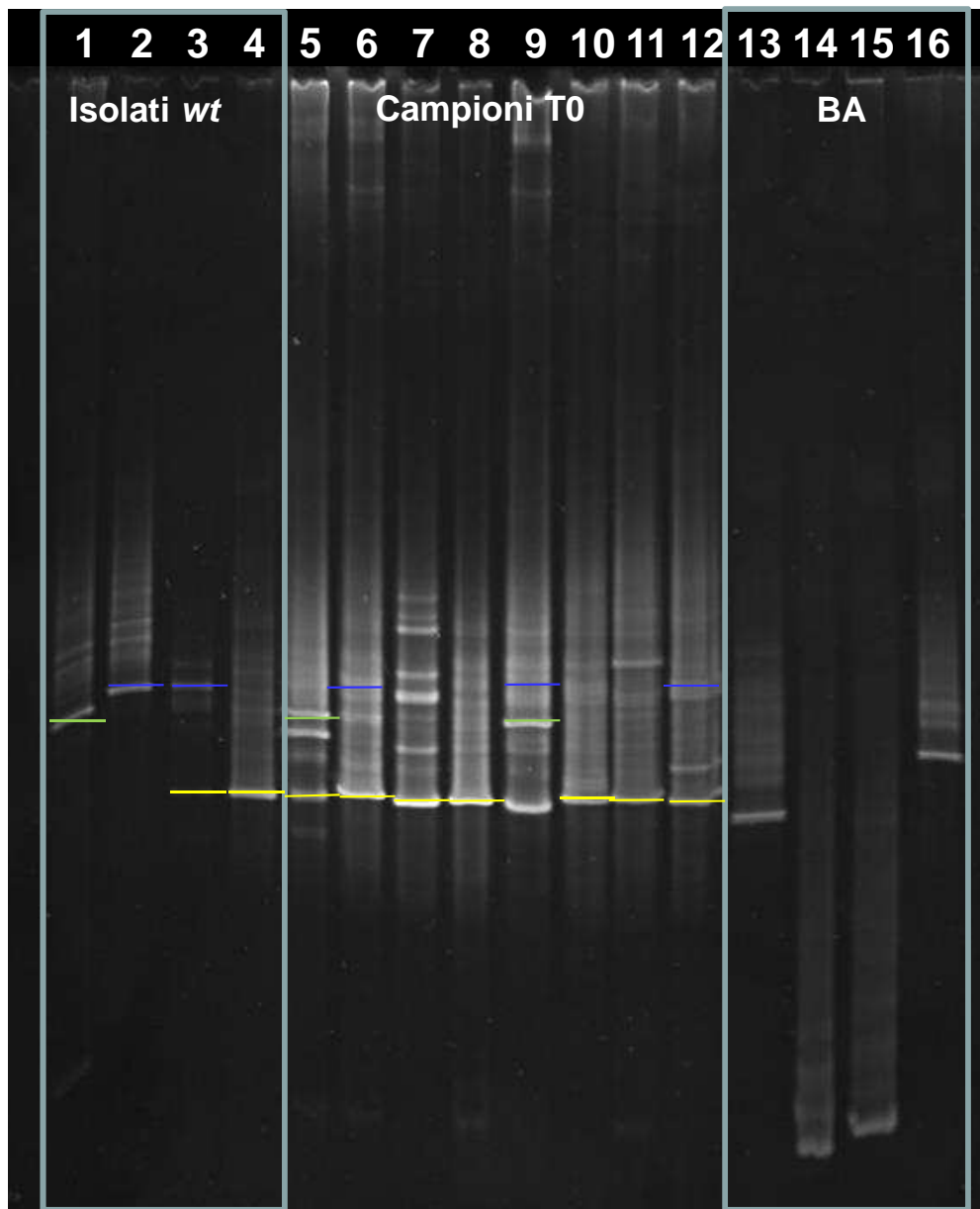
14) *Komagataeibacter xylinus*

15) *Gluconacetobacter liquefaciens*

16) *Gluconobacter oxidans*

Non sono presenti bande alle  
altezze tipiche dei  
batteri acetici (BA)

# Analisi coltura-indipendente : PCR-DGGE con primer per batteri acetici WBAC1-WBAC2



1 - 4) quattro isolati *wt* da GYC sono stati impiegati come *ladder*

5 -12) campioni T0 da tonneaux

13) *Acetobacter aceti*

14) *Komagataeibacter xylinus*

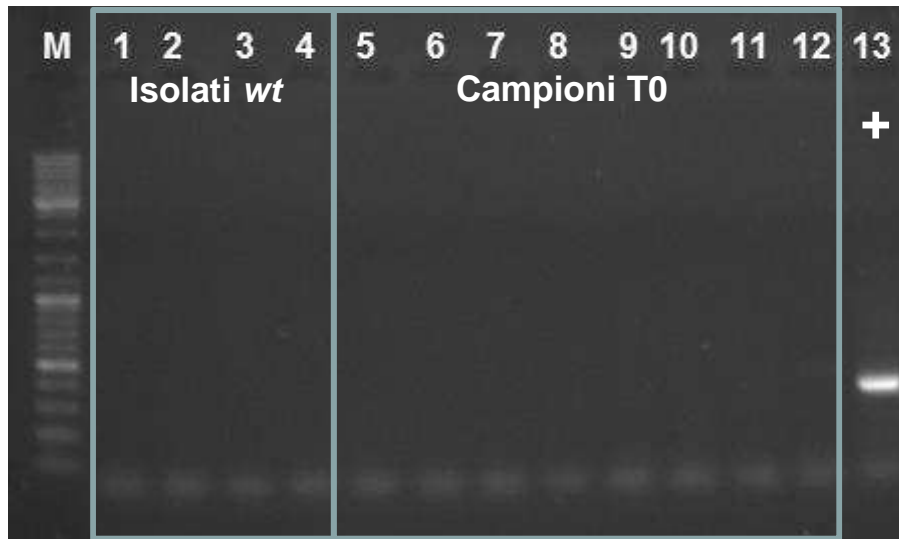
15) *Gluconacetobacter liquefaciens*

16) *Gluconobacter oxidans*

Non sono presenti bande alle altezze tipiche dei BA (Lopez *et al.*, 2003).

Si amplificano anche i 4 GYC *wt*

# Presunti batteri acetici : i dati molecolari



Verifica della presenza di BA con una PCR disegnata su una subunità della alcol deidrogenasi PQQ-ADH (dati in via di pubblicazione).

La PCR su ADH conferma che nessuno degli isolati GYC *wt* è positivo per questo gene



La sequenza del 16S rRNA conferma che appartengono a specie differenti:

- *Kluyvera cryocrescens*
  - *Pseudomonas oryzae*
  - *Carnobacterium viridans*
  - *Carnobacterium inhibens*
- } Gram-negativi
- } Gram-positivii



# Presunti batteri acetici : la scelta dei mezzi di coltura



GYC

*Kluyvera cryocrescens* e *Pseudomonas oryzae* sviluppano anche su altri mezzi consigliati per analisi su mosti e su vini:

- Medium G2 (pH 5,0)
- *Kneifel* medium (etanolo 2%) e
- GYC modificato (pH 5,0)



Medium G2



*Kneifel* medium



GYC modificato (pH 5,0)

# Considerazioni finali

- I contenitori di legno possono essere popolati da **eterogenee popolazioni microbiche** e anche da un microbiota apparentemente inusuale per il settore enologico;
- **l'igiene** in cantina è un fattore importante;
- i dati indicano che il protocollo di **sanitizzazione** che prevede l'uso di **O3 in forma gassosa** risulta **efficace**;
- i **metodi coltura- dipendente** richiedono adattamenti nel passare da mosto e vino ad ambienti enologici
- i metodi coltura-dipendente forniscono una identificazione grossolana, che richiede di essere validata da **metodi molecolari**.

# Ringraziamenti

Le cantine, gli enologi e i tecnici per il loro supporto nel condurre le sperimentazioni.



- la ricerca su microbiota dei legni;
- lo stage e della ricerca che ha portato alla Tesi di Laurea: *"Applicazione di metodi molecolari per l'identificazione di batteri acetici coinvolti nel processo di acetificazione"*



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE!