Connaissance Vigne Vin, 1983, **17**, N° 3, 183-193.

CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES BOUCHONS. BOUCHONS STERILES CONDITIONS DE CONSERVATION DES BOUCHONS

Anne CASTERA-ROSSIGNOL

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

Les microorganismes, associés aux bouchons de liège, peuvent avoir des effets néfastes sur la qualité organoleptique d'un vin, par leur présence, mais surtout par la diffusion de certains de leurs métabolites (odeurs de « moisi », « goûts de bouchon », etc...) et, éventuellement, en tant que contaminants des vins embouteillés « stériles » (NERADT, 1982).

LA MICROFLORE DES BOUCHONS DE LIEGE

Différentes études ont été réalisées sur les champignons (MOREAU, 1977 ; 1978 a et 1978 b), mais il n'existe que peu de données sur la flore bactérienne et levurienne.

L'origine de la flore finale du bouchon peut être de deux types : soit endogène au liège, soit mise en place au cours de la récolte et du stockage en forêt et de recontamination, due aux manipulations, au transport et à la conservation du produit fini ainsi qu'au séjour en cave.

La flore du bouchon n'est donc pas « statique » ou uniforme au cours du temps ; on a, au contraire, une succession de souches d'origine et d'écologie différentes (fluctuations de l'hygrométrie, de la température, du substrat). Les espèces fongiques pionnières, aérobies, sont par exemple partiellement détruites au contact du vin, laissant place à des formes, sporulées ou non, plus résistantes dans le milieu alcoolisé et acide qu'est le vin.

La microflore du bouchon est surtout constituée de *moisissures,* qui se développent préférentiellement dans les lenticelles. Ces champignons microcospiques, aérobies produisent des enzymes hydrolysantes, capables d'attaquer les différents constituants lipidiques, polysaccharidiques, phénoliques ou tanniques du liège, par dépolymérisation, oxydation ... Leurs formes de sporulation asexuée sont capables de survivre en milieu très sec.

Communication présentée au colloque « Aspect actuels de l'embouteillage des vins ». Bordeaux, 16 juin 1983.

Dans une étude sur des bouchons de liège portugais, MOREAU (1978 a) cite *Aspergillus conicus* comme espèce pionnière, capable d'utiliser l'eau liée des cellules, responsable de la couleur « gris bleuté » de certains bouchons et rencontrée dans tous les échantillons étudiés. *Penicillum frequentans* (responsable de la « subérose ») à forte activité enzymatique, se présente comme intermédiaire dans la chaîne fongique, ainsi que *Penicillium granulatum, P. glabrum, P. spinulosum* et *Trichoderma viride. Penicillium roqueforti* est apte à se développer en présence de vin, surtout si le bouchon est recouvert d'une capsule métallique de surbouchage (MOREAU, 1978 b).

DAVID et *al.* (1981 a) citent quatre genres prédominants : *Penicillium, Trichoderma, Cladosporium, Monilia,* ils ne décèlent que très rarement des *Aspergillus.*

Pour notre part, nous avons pu isoler sur des rondelles de bouchons de champagne de nombreux *Penicillium (P. expansum, Link, P. frequentans Westling, P. roqueforti* Thomas, *P. corylophilum, P. echinulatum),* des *Trichoderma (T. longibrachiatum, T. hamatum),* une souche colonisante, *Chysonilia crassa* du genre *Monilia* et, dans certains cas, *Cladosporium sp., Monodictys sp., Sistotrema sp., Ulocladium sp., Eurotium herbariorum* et *Botrytis cinerea.* RIBOULET (1982) isole aussi *Aspergillus versicolor, Aspergillus repens* et quelques actinomycètes dont un *Streptomyces sp.* capable de dégrader la vanilline en gaïacol.

Les levures, malgré leur métabolisme fortement oxydatif, ne semblent pas caractéristiques de la microflore du bouchon. Les genres : *Rhodotorula, ,Candida, Sporobolomyces, Cryptococcus, Kloeckera, Torulopsis* ou *Saccharomyces* sont cités par BUREAU et *al.* (1974) ; MOREAU (1977) ; DAVIS et *al.* (1978 a) et DALY (1982), comme étant présents dans quelques échantillons étudiés seulement. Pour notre part, seule la souche *Cryptococcus laurentii* a été isolée.

Parmi les *bactéries,* on peut citer de fréquents microcoques et staphylocoques, témoins de contaminations humaines. Nous avons pu également isoler une souche de *Rhodococcus* et surtout de très nombreux *Bacillus ;* ces derniers, capables de sporuler facilement survivent à des a_w très faibles (DALY, 1982).

CONTROLE MICROBIOLOGIQUES DES BOUCHONS

Il est nécessaire de distinguer d'une part, le contrôle de routine, applicable facilement dans les entreprises (fig. 1) et d'autre part, l'isolement systématique quantitatif et qualitatif de la flore totale d'un bouchon, ne pouvant être pratiqué que par un laboratoire de recherche.

Cette notion de flore totale doit, par ailleurs, être analysée avec prudence car, mis à part les phénomènes réels de diffusion dans les lenti-

celles ou de contact à la surface, on peut s'interroger sur le rôle des spores ou des formes végétatives prises à l'intérieur même du tissu subéreux et leurs possibilités « d'échanges » avec le vin.

Il faut également distinguer l'approche *quantitative* du contrôle (évaluation de la propriété microbiologique globale d'un lot de bouchons) de l'approche *qualitative*, où l'on cherchera à mettre en évidence la souche ou les souches pouvant être la cause de mauvais goûts.

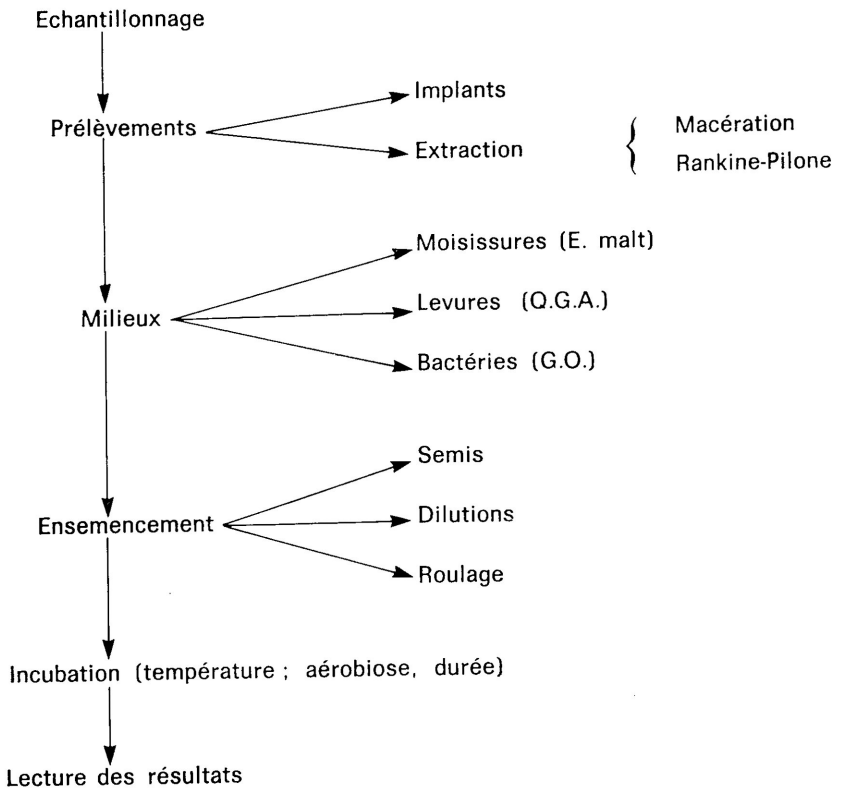

Fig. 1. — Protocole de contrôle microbiologique des bouchons de liège

1°) **Echantillonnage**

la technique d'échantillonnage conditionnera la qualité globale de l'analyse. Il est nécessaire de prendre au hasard, pour une étape de fabrication donnée, plusieurs échantillons par lot (1 à 10) et plusieurs lots par balle (1 à 10), sans oublier d'en noter la provenance exacte. Il existe une norme ISO de prélèvement statistique n° 4707-1981 (F), mais on peut aussi se référer aux tables d'échantillonnage des recueils de normes de la statistique de l'AFNOR (1974).

2°) **Prélèvements**

Les prélèvements peuvent s'effectuer sous forme de petits *implants* découpés à la périphérie ou à cœur du bouchon (MOREAU, 1978 a, préconise des zones de prélèvement par tiers de bouchon). Ces méthodes rendent assez bien compte de la flore du bouchon mais nécessitent des manipulations de découpage délicates. *La macération* dans de l'eau distillée stérile, additionnée ou non de sel, pendant au moins 15 mn. ne permet d'extraire qu'une partie de la flore de surface et des lenticelles.

TABLEAU I

Dénombrement comparatif des microorganismes, de trois qualités de bouchons, par la méthode RANKINE-PILONE
(D'après P. MARTY, 1983)

Les résultats sont exprimés en nombre de germes par bouchon

Qualité des bouchons	Microorganismes			
	Levures	Moisissures	Bactéries totales	Bactéries anaérobies
1re	0	275 000	2166	0
2e	0	356 666	3500	0
3e	0	483 333	7850	0

La méthode la plus efficace est celle préconisée par RANKINE-PILONE, citée par DAVIS et *al.* (1981 b) : on plonge plusieurs bouchons dans la solution décrite précédemment, dans une fiole sous vide et l'on provoque des ruptures séquentielles de vide. Ceci a pour effet de forcer les échanges entre le liquide d'extraction et le volume des lenticelles. Il est à noter que la flore intrinsèque au tissu du liège, n'est pas ou peu extraite. Cependant, d'après une étude statistique récente (MARTY, 1983), les résultats quantitatifs sont reproductibles à ± 16 p. 100 pour un lot de bouchons présentant les densités de population microbienne similaires. Cette méthode est donc suffisamment fiable et rapide pour un contrôle de routine ; nous donnons, à titre d'exemple dans le tableau I, des résultats pour différentes qualités de bouchons.

3°) **Milieux de culture**

Les milieux de culture les plus pratiques et les moins sélectifs sont : l'Oxytétracycline Glucose Agar (O.G.A.) pour les levures, une gélose à base d'extrait de levures et de peptone pour le dénombrement des bactéries, de l'extrait de Malt gélosé à 2 p. 100 pour les moisissures.

MOREAU et *al.* (1964) préconise, pour les espèces osmophiles, l'extrait de Malt à 5 p. 100 additionné de chlorure de sodium à 5 p. 100. Le milieu de Czapek Dox est bien adapté pour les *Aspergillus* et les *Penicillium.* KING et *al.* (1979) propose pour les souches envahissantes un milieu additionné de Rose Bengal, de dichloran et de chlortétracycline.

4°) **Ensemencements**

Se réalisent sous forme de *semis* pour les implants ou de dépôts de *dilutions* (10° à 10^{-5}), de la solution d'extraction, en surface ou en profondeur du milieu de culture. On peut également directement rouler le bouchon sur la gélose (flore de surface) ou incuber une membrane stérilisante après filtration de la solultion d'extraction. Il est nécessaire de préparer au moins trois boîtes de chaque milieu, pour chaque échantillon.

5°) **Température et temps d'incubation**

Pour déterminer la flore globale mésophile, on choisit une *température d'incubation* de 23-25 °C, optimale pour la croissance de la plupart des moisissures. Pour les bactéries anaérobies, on utilise des jarres d'anaérobiose.

Le temps d'incubation varie de 1 à 8 jours suivant les espèces.

6°) **Expression des résultats**

Les résultats pourront s'exprimer en nombre de colonies formées (NCF) par millilitre de solution d'extraction ou par gramme de liège, puis par bouchon.

NOTION DE BOUCHON « STERILE »

Des bouchons dits « stériles » sont actuellement commercialisés ; cette qualité doit être considérée comme indépendante du classement officiel basé sur l'aspect global extérieur. Ces bouchons ont généralement été traités au SO_2 *gazeux* ou aux *rayons* γ. La stérilité, au sens microbiologique, à savoir « absence de germes dans une quantité donnée de produit » n'est jamais atteinte. Par exemple, MARAIS et KRUEGER (1975) montrent qu'une dose aux rayons γ de 3 MR, à 26 °C, pendant 10 h ne détruit, dans certains cas, que 25 p. 100 des germes revivifiables. Des tests ont été réalisés dans notre laboratoire sur des bouchons commercialisés « stériles » et ont montré la présence de spores bactériennes.

Au niveau des différents *traitements technologiques* appliqués au cours de la fabrication des bouchons, celui du bouillage des planches de liège peut avoir un effet réducteur sur les bactéries thermo sensibles. Les vapeurs de colle utilisée pour le colmatage peuvent aussi être germicides (MARTY, 1983). L'acide oxalique et l'hypochlorite de sodium en solution aqueuse, utilisés dans les bains de coloration, ont un effet bacté-

TABLEAU II

Action de quelques agents sur la microflore du liège

(D'après P. MARTY, 1983)

Les résultats sont exprimés en nombre de germes par bouchon

	Moisissures	Bactéries totales
Témoin	6.816.666	83.333
Eau de Javel (12°) Acide Oxalique (11,75 g/l)	19.000	0
Formol 2 p. 100	0	333
Formol 4 p. 100	0	166
Rayons gamma (2,5 M rad)	3.408.333	0

Il n'a pas été décelé de levures dans le témoin.

TABLEAU III

Effet de l'activité de l'eau sur la croissance des moisissures des bouchons

Croissance après 3 semaines à 20 °C
(D'après N.M. DALY, 1982)

Moisissures	0,75	0,80	0,85	0,97
Penicillium granulatum	—	—	+	+
Penicillium glabrum	—	—	+	+
Penicillium spinulosum	—	+	+	+
Trichoderma sp (1)	—	—	—	+
Trichoderma sp (2)	—	—	—	+
Cladosporium herbarum	—	—	—	+
Paecilomycès sp.	—	—	+	+
Rhizoctomia sp	—	—	—	+
Mucor sp	—	—	—	+
Aspergillus sp.	—	+	+	+

+ : croissance — : pas de croissance

ricide mais n'agissent que très peu sur la flore fongique (tableau II) ; alors que la formaldéhyde et l'anhydride sulfureux ont une bonne action fongicide mais sont des bactéricides moins efficaces (DAVIS et *al.*, 1982).

On pourrait alors préconiser un traitement combiné au formol, à l'eau de javel et à l'acide oxalique, en prenant soin de brasser et de rincer les bouchons à l'eau claire entre chaque bain et de renouveler fréquemment ces différents bains (MAQUES GOMEZ, 1983).

Au niveau expérimental, ont été envisagées des possibilités de stérilisation par l'oxyde d'éthylène, les radiations U.V., les bains d'eau bouillante additionnée d'acide salicylique, d'éthanol et de polyamide, ou de chlorure de méthylène et de silicone (MOREAU et *al.*, 1976).

Dans tous les cas, le bouchon le liège étant un matériau très résistant aux différentes attaques chimiques ou physiques, il est toujours difficile d'atteindre la flore interne. C'est pourquoi il ne faut pas parler de bouchons « stériles » mais de bouchons « pauvres en germes ».

Le conditionnement des bouchons doit préserver leur propreté microbiologique. Les bouchons traités devraient être emballés dans un local isolé du reste de l'unité de fabrication, de façon à éviter les recontaminations par l'air. Ils doivent être soigneusement séchés avant de les regrouper dans des poches de polyéthylène, dont l'atmosphère serait enrichie en SO_2 avant fermeture. L'utilisation des bouchons doit alors se faire dans les deux mois suivants.

Pour éviter des condensations internes, favorisant le développement microbien, il est nécessaire de contrôler parfaitement l'humidité des bouchons conditionnés.

En effet, les microorganismes et principalement les moisissures sont très sensibles à l'activité de l'eau, a_w (tableau III).

Nous rappelons que l'activité de l'eau « a_w » — water activity — correspond à l'humidité relative d'équilibre d'une substance par rapport à l'atmosphère qui l'entoure. On la définit alors comme le rapport de la pression de vapeur de l'eau dans le milieu par rapport à la pression saturante de vapeur de l'eau pure à la même température. L'a_w est nulle pour les produits à 100 p. 100 de matière sèche, et tend vers 1 pour les produits très humides à une température donnée.

Pour une teneur en eau donnée du liège, l'a_w varie en fonction de la température.

D'autre part, le liège présente des propriétés d'absorption et de désorption d'eau particulières, caractérisées par les courbes de la figure 2.

Dans les conditions moyennes de stockage (20 °C) des risques de développement microbien sont possibles à partir d'une a_w de 0,75.

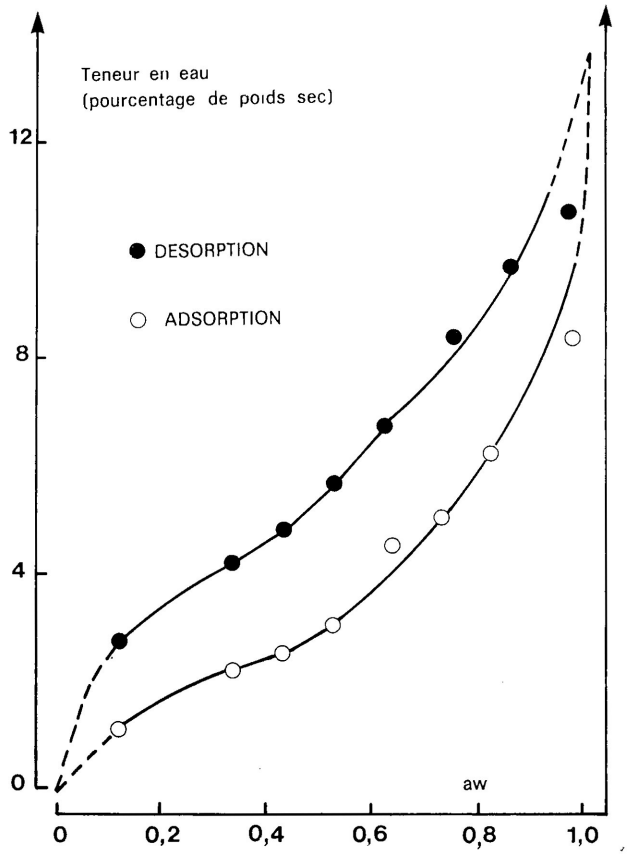

Fig. 2. — Isothermes de sorption pour le bouchon à 20 °C. (D'après N.M. DALY, 1982).

Malgré ces précautions de transport, des recontaminations sont inévitables après la mise en bouteilles. En effet, l'ambiance humide des caves favorise la présence et la dispersion d'une flore fongique importante *(Aspergillus, Penicillium)* et d'une flore de contamination des vins.

CONCLUSION

Même si un traitement de stérilisation totale est mise au point, il est illusoire d'envisager l'utilisation de bouchons stériles sans prévoir une importante désinfection des locaux de conditionnement de ces bouchons. Cependant, quelle est l'utilité d'un bouchon stérile ? Evitera-t-il les accidents de goûts de bouchon ? Jusqu'à présent, beaucoup d'identifications sur la microflore du liège ont été réalisées, mais les conséquences du métabolisme des espèces trouvées, ne sont pas encore assez connues. Ces travaux nécessiteront de longues recherches, étroitement liées à l'analyse chimique du goût de bouchon ; elles ont pour but de déterminer s'il y a des souches responsables de ces défauts.

Actuellement, au niveau du fabricant, il est important d'essayer d'obtenir des bouchons les plus sains possibles, au moins pour des raisons hygiéniques. Le protocole expérimental, décrit ici, est tout à fait satisfaisant pour contrôler l'état microbiologique des bouchons utilisés.

Manuscrit reçu le 4 juillet 1983 ; accepté pour publication le 5 août 1983.

RESUMÉ

Après un rapide inventaire bibliographique de la microflore du liège, un protocole expérimental de contrôle de la qualité globale microbiologique des bouchons est décrite avec, en particulier, l'extraction des microorganismes par la méthode RANKINE-PILONE. Les différents traitements du bouchon sont examinés pour leur action microbicide spécifique ainsi que l'influence du stockage des bouchons sur leur stabilité microbiologique. La notion de « bouchon stérile » est alors discutée.

SUMMARY

After a short bibliography of the cork microflora, an experimental protocol for testing the microbiological quality of the corks is described, including the microflora extraction by the RANKINE-PILONE method. The specific sterilizing action of the different cork treatments and the influence of cork storage on their microbiological stability are studied. The notion « sterile cork » is then discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem schnellen Inventar der Literatur über die Kleinlebewesend des Korks, wird ein Versuchsprotokoll der Kontrollierung der Gesamtsqualität der Mikrobiologie des Korks erklärt. Es wird besonders auf die Ausziehung der Mikroorganismen durch die Methode RANKINE PILONE aufmerksam gemacht.

Die verschiedenen Behandlungen des Korks sind über ihre Spezialwirkung auf die Mikroben untersucht.

Man spricht ebenfalls vom Einfluss der Lagerung der Körke auf ihre mikrobiologischen Stabilität.

Der Begriff " Keimfreier Kork " ist dann erördnert.

RESUMEN

Después de una rápida revisión bibliográfica de la microflora del corcho se describe un protocolo experimental para el control de la calidad global microbiológica de los tapones ; en particular, la extracción de los microorganismos por el método RANKINE-PILONE. Se examinan los distintos tratamientos del tapón en cuanto a su acción microbicida específica, así como la influencia del almacenamiento de los tapones sobre su estabilidad biológica. Tambien se discute la noción de " tapón estéril ".

RIASSUNTO

Dopo un rapido inventario bibliografico della microflora del sughero, un protocollo sperimentale del controllo della qualità globale microbiologica dei

tapi é descrito con specialmente l'estrazione dei microorganismi con il metodo di RANKINE-PILONE. I differenti trattamenti del tapo sono esaminati per la loro azione microbicida epscifica e l'influenza dello stoccaggio dei tapi sulla loro stabilità microbiologica. La nozione di « tapo sterile » é allora discussa.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, 1974. Recueil de normes de la statistique. Tome 1, Ed. Association Française de Normalisation, Paris.

BUREAU G., CHARPENTIER-MASSONAT M. et PANSU M., 1974. Etude des goûts anormaux apportés par le bouchon sur le vin de champagne. *Rev. Fr. Œnologie,* 56, 22-24.

DALY N.M., 1982. The microbiology of wine corks. *Thesis for the degree of Bachelor of Science* (Food Technology), University of New New South Wales, Australie, 127 p.

DAVIS C., FLEET G. et LEE T., 1981 a. The microflora of wine corks. *Australian grapegrower winemaker,* 208, 42-44.

DAVIS C., FLEET G. et LEE T., 1981 b. An appraisal of the Rankine-Pilone method for testing the sterility of cork. *Australian grapegrower winemaker,* 208, 56.

DAVIS C., FLEET G. et LEE T., 1982. Inactivation of wine cork microflora by a commercial sulfur dioxide treatment. *Am. J. Enol. Vitic.,* **33,** N° 2, 124-127.

KING A.D., HOCKING A.D. et PITT J.I., 1979. Dichloran Rose Bengal Medium for Enumeration and Isolation of Molds from Foods. *App. and Environm. Microbiology,* **37,** N° 5, 959-964.

MAQUES GOMEZ J.V., 1983. Aspectos microbiologicos ligados à desinfecçao das rolhas de cortiça usadas uo engarra famento de vinho do porto. *Boletim de Instituto dos Produtos Florestais,* Cortica, 531, 5-11.

MARAIS P.G. et KRUEGER M.M., 1975. Fungus contamination of corks responsible for unpleasant odours in wine. *Phytophylactica,* 7, 115-116.

MARTY P., 1983. Contrôle de la qualité microbiologique du bouchon de liège. *Mémoire de stage en vue du Diplôme National d'Œnologue,* Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II, 53 p.

MOREAU C., MOREAU M. et PELHATE J., 1964. Choix de milieux de culture sélectifs pour l'analyse de mycoflores osmophiles. *Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr.,* 80, 234-246.

MOREAU M., MOREAU C. et LE BRAS M.A., 1976. Quelques moisissures responsables d'altérations des bouchons de champagne. *Ind. Alim. Agric.*, 3, 317-320.

MOREAU M., 1977. Altérations des bouchons par quelques moisissures *Rev. Fr. Œnologie*, 66, 63-67.

MOREAU M., 1978 a. La mycoflore des bouchons de liège — son évolution au contact du vin — conséquences possibles du métabolisme des moisissures. *Rev. Mycol.*, 42, 155-189.

MOREAU M., 1978 b. Les moisissures des bouchons. *C.R. Acad. Agric.*, **68**, N° 10, 842-849.

NERADT F., 1982. Sources of reinfections during cold-sterile bottling of wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, N° 3, 140-144.

RIBOULET J.M., 1982. Contribution à l'étude chimique et microbiologique des « goûts de bouchon » dans les vins. *Thèse de Doctorat en Œnologie-Ampélologie*, n° 86, Université de Bordeaux II, 191 p.