



Intervento realizzato con il finanziamento FEASR del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana - Bando attuativo della Sottomisura 1.2

PROGETTO SOTTOMISURA 16.2 PSR 2014-2020 della Regione Toscana



G.R.A.P.E.

GESTIONE RAPIDA PROBLEMATICHE ETILFENOLI

*Strumenti e processi di valorizzazione della qualità delle produzioni
viticoliche DOP toscane QUALI.DOP.VIN.*

Follonica, mercoledì 29 giugno 2022



 A Tentamus Company

OBIETTIVI

- Protocollo di monitoraggio di *Brettanomyces bruxellensis* lungo l'intera filiera vitivinicola;
- contenere il suo sviluppo;
- abbassare l'incidenza delle partite non idonee al commercio.

AZIONI

- In vigneto;
- negli impianti di trasformazione e vinificazione;
- a livello di prodotto finale.



G.R.A.P.E.

GESTIONE RAPIDA PROBLEMATICI ETILFENOLI



- **CENTRO ANALISI CAIM**

- **AZIENDE VITIVINICOLE**

- FATTORIA SAN FELO
- VAL DI TORO
- VAL DELLE ROSE
- CACCIAGRANDE

- **SOGGETTI SCIENTIFICI**

- C.N.R. «Istituto per la BioEconomia» - Az. Agr. Santa Paolina
- Dipartimento di Scienze Della Vita – Università di Siena



G.R.A.P.E.

AZIONI PROGETTUALI



- ✓ VIGNETI
- ✓ LOCALI E ATTREZZATURE DI CANTINA
- ✓ MOSTI IN FERMENTAZIONE
- ✓ VINO IN AFFINAMENTO

- ✓ VIGNETI
- ✓ CANTINA



Intervento realizzato con il finanziamento FEASR del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana - Bando attuativo della Sottomisura 1.2

1. PROGRAMMAZIONE DEGLI INTERVENTI E INDIVIDUAZIONE DEI VIGNETI



G.R.A.P.E.

AZIONI PROGETTUALI



- 4. PROTOCOLLO DI MONITORAGGIO DEL VIGNETO**

- 5. MANUALE DEI TRATTAMENTI DI CAMPO**

- 6. PROTOCOLLO DEI MONITORAGGI DELLE ATTREZZATURE E DELL'ARIA IN CANTINA.**

- 7. MANUALE DEGLI INTERVENTI PER LA RIDUZIONE DI B. BRUXELLENSIS NELLA FILIERA VITIVINICOLA**



VITALITA' - COLTIVABILITA' = **VBNC** →

0,4 mg/L SO₂ in SWM (Agnolucci et al., 2010)

0,8 mg/L SO₂ in SWM (Serpaggi et al., 2012)

0,25 mg/L SO₂ in vino (Du Toit et al., 2005)

1,4 mg/L SO₂ in vino (Agnolucci et al., 2013)

Secondo le normali pratiche enologiche i tenori di anidride solforosa libera consigliati per la conservazione dei vini variano da 20 a 30 mg/l. (Ribereau Gayon et al., 2003)

pH = 3.5

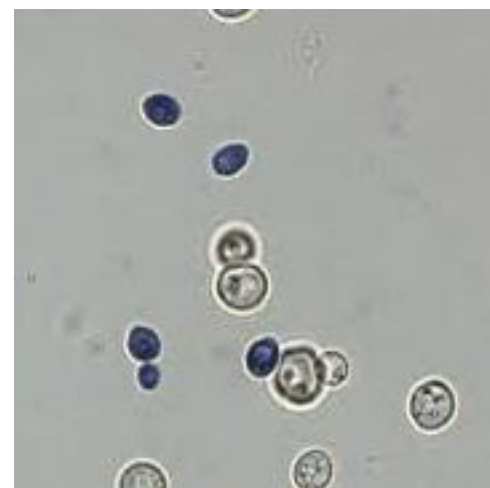
13% etanolo (v/v)

T = 19°C



0.67-1 mg/l

SO₂ molecolare





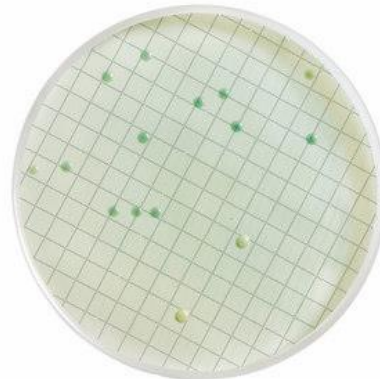
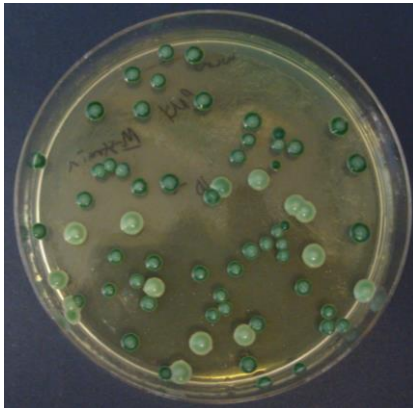
G.R.A.P.E.

TECNICHE MICROBIOLOGICHE PER LA RICERCA DI BRETTANOMYCES



TECNICHE CULTURA DIPENDENTI

- Terreni di coltura selettivi
 - ✓ *WL + Cicloesimide*
 - ✓ *DBDM*
- Terreni di arricchimento
 - ✓ *EBB medium*

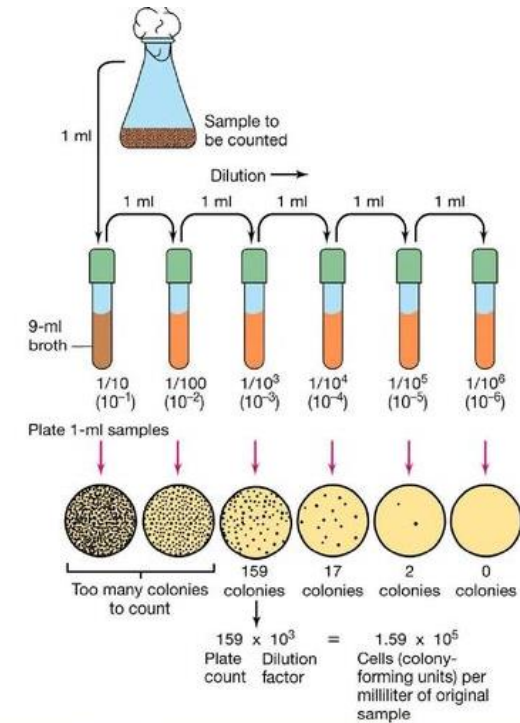


Journal of Applied Microbiology 2001, 90, 588-599

Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*

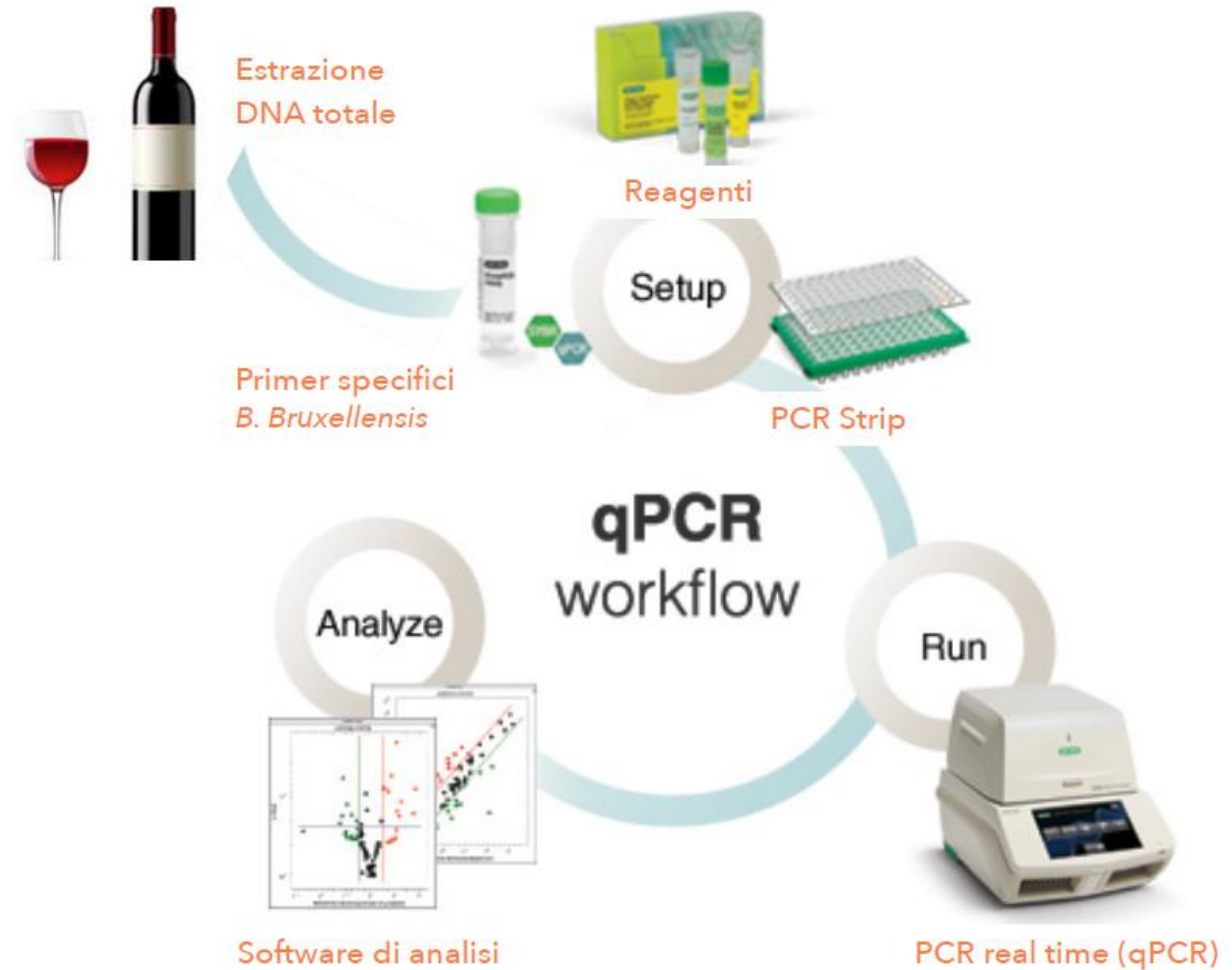
N. Rodrigues, G. Gonçalves, S. Pereira-da-Silva, M. Malfeito-Ferreira and V. Loureiro

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal



TECNICHE COLTURA INDIPENDENTI

Tecniche basate sull'analisi del DNA
estratto da uva, mosto, vino



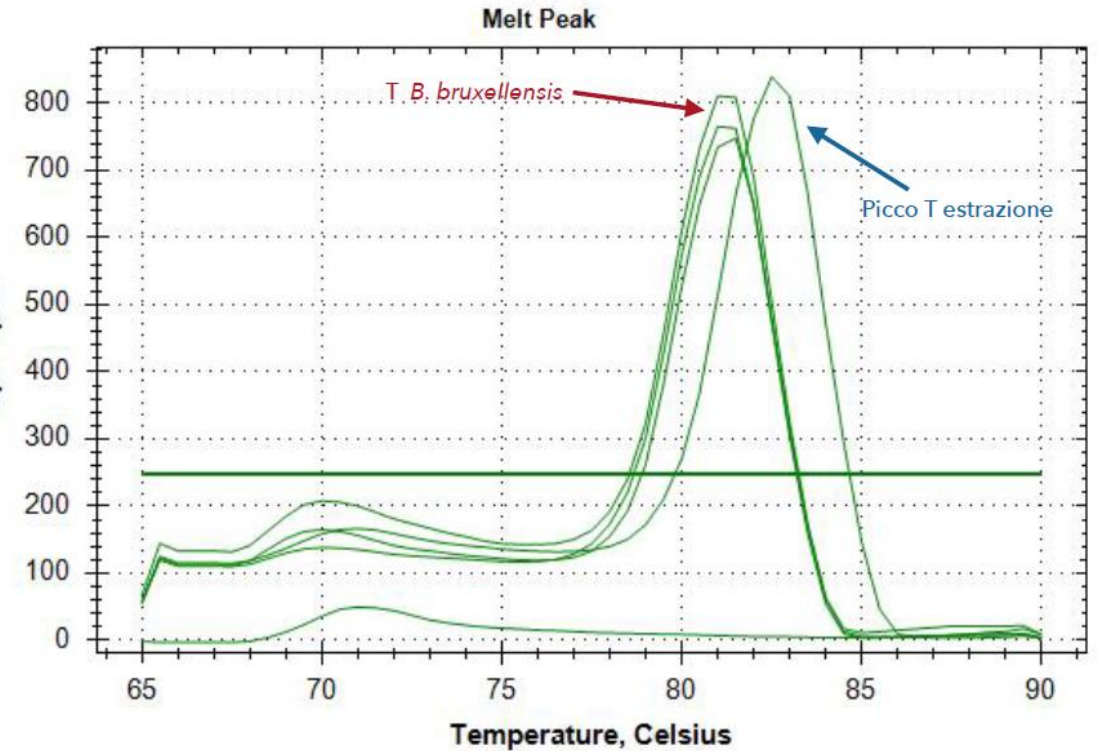
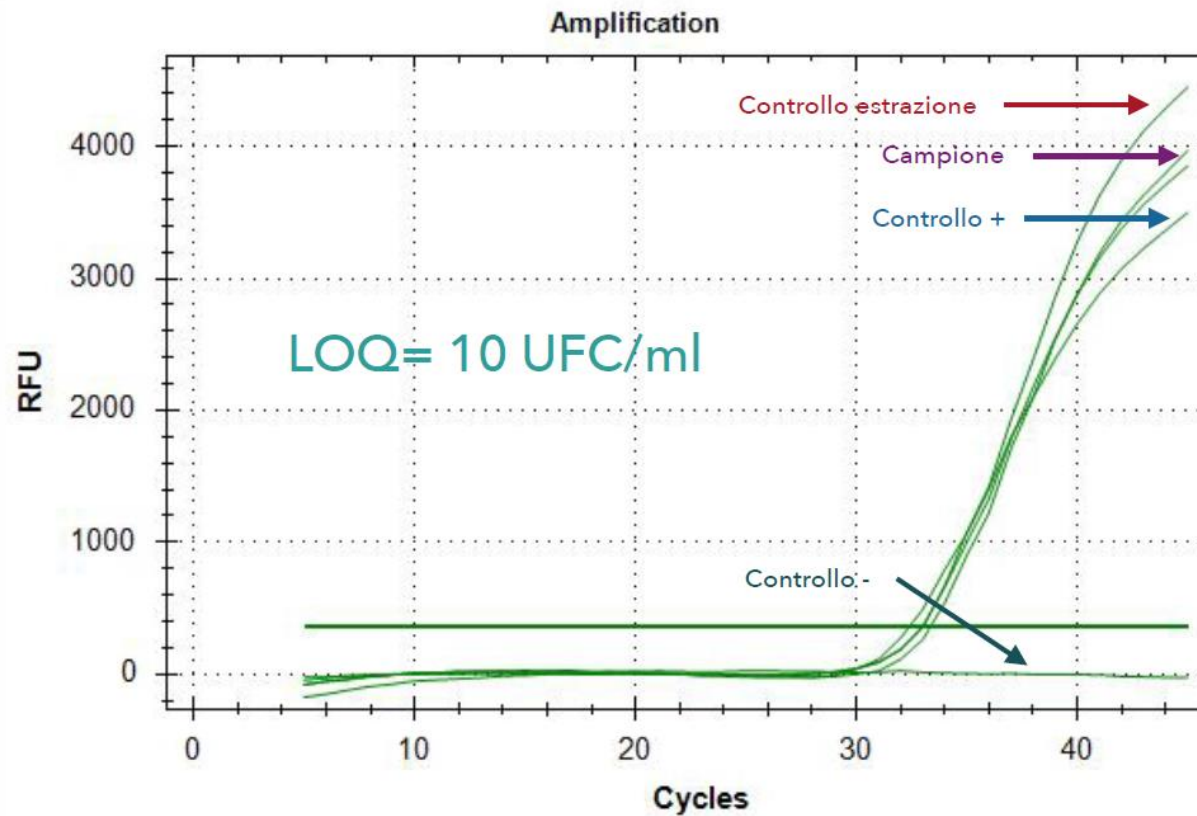


G.R.A.P.E.

TECNICHE MICROBIOLOGICHE PER LA RICERCA DI
BRETTANOMYCES



TECNICHE COLTURA INDIPENDENTI



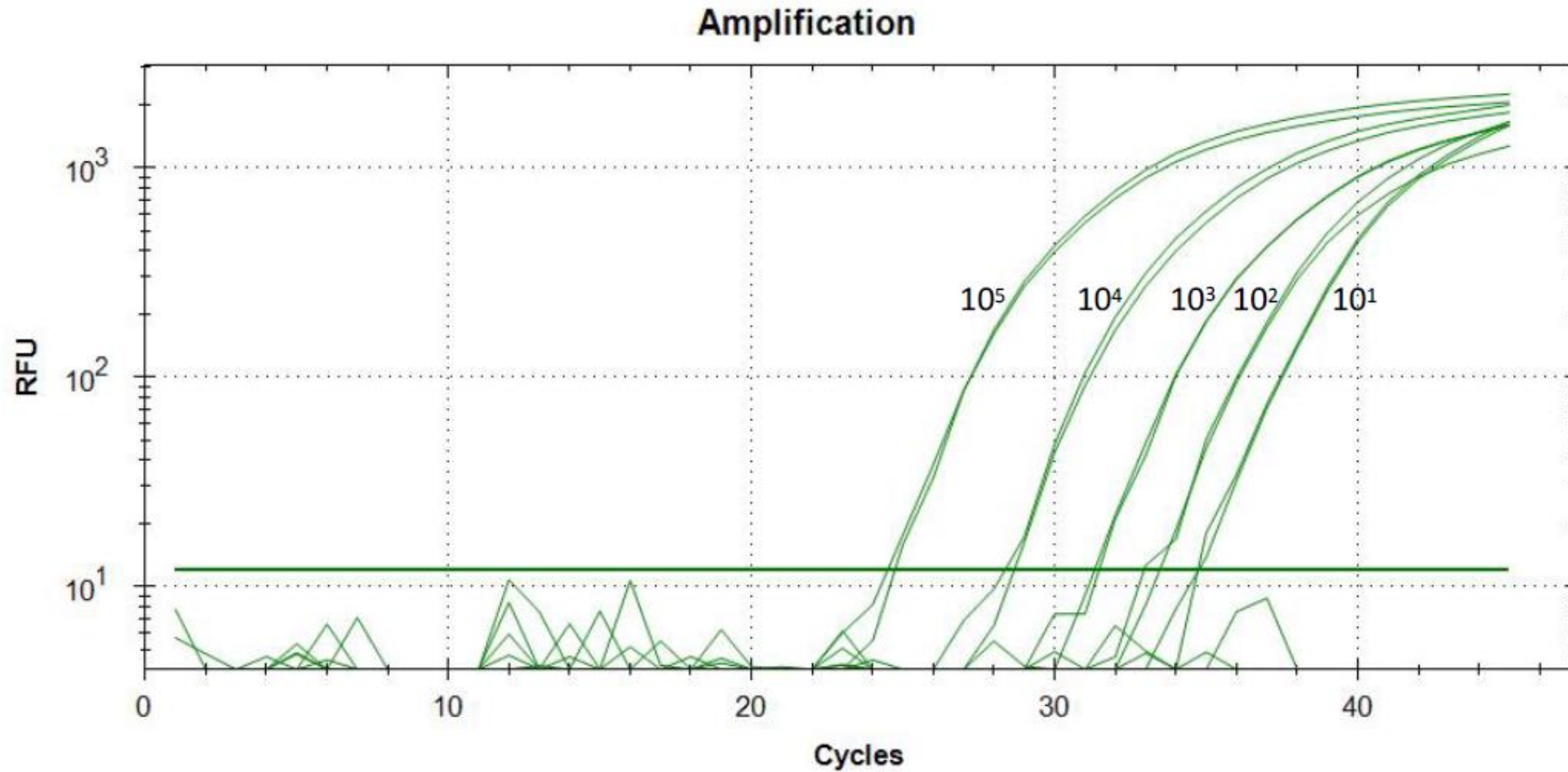


G.R.A.P.E.

TECNICHE MICROBIOLOGICHE PER LA RICERCA DI
BRETTANOMYCES



TECNICHE CULTURA INDIPENDENTI





G.R.A.P.E.

MESSA A PUNTO E REALIZZAZIONE DEI MONITORAGGI



- Monitoraggio dei vigneti
- Monitoraggio dei locali e delle attrezzature di cantina
- Monitoraggio dei mosti in fermentazione
- Monitoraggio del vino in affinamento



G.R.A.P.E.

METODI DI MONITORAGGIO



1. Real-Time PCR (qPCR) *(Tofalo et al., 2012; Agnolucci et al., 2007; Lloha et al., 2019)*

- ✓ UVE PRESSATE
- ✓ MOSTI IN FERMENTAZIONE
- ✓ VINI IN AFFINAMENTO

**Coltura
indipendente**

1. Terreno di arricchimento – *EBB medium* *(Renouf e Lonvaud-Funel, 2007)*

2. *Dekkera/Brettanomyces* differential medium – DBDM *(Rodrigues et al., 2001)*

3. Amplificazione regione 5.8S-ITS degli isolati *(Esteve-Zarzoso et al., 1999)*

- ✓ UVE
- ✓ SPUGNE ATTREZZATURE

**Coltura
dipendente**

1. Campionamento attivo aria in DBDM *(Ocon et al., 2013)*

- ✓ ARIA



G.R.A.P.E.

INTERVENTI DI CONTENIMENTO E CONTRASTO
VIGNETO



Amylo-X® LC

Fungicida e battericida microbiologico a base di *Bacillus amyloliquefaciens*, ceppo D747 in formulazione liquida.

- competizione per fonti nutritive e spazio
- produzione di sostanze (Lipopeptidi) antimicrobiche
- induzione di resistenza nei confronti della pianta



G.R.A.P.E.

INTERVENTI DI CONTENIMENTO E CONTRASTO
VIGNETO



AQ 10® WG

Fungicida antioidico a base di *Ampelomyces quisqualis*

- Competizione per le fonti nutritive e lo spazio vitale



CHITOSANO BIOREND

- Elicitore dei meccanismi di autodifesa della pianta

➤ Protocollo trattamenti

- Sett. 1: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha
 - Sett. 2: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha
 - Sett. 3: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha
 - Sett. 4: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha
 - Sett. 5: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha
 - Sett. 6: AMILO-X 2 Kg/Ha, AQ 10 WG 60 g/Ha, BIOREND 3 L/Ha
- Inizio 15 luglio 2019 ogni 10 giorni.
- Distribuzione a Basso Volume (200 l/ha) sulla fascia grappolo.





G.R.A.P.E.

INTERVENTI DI CONTENIMENTO E CONTRASTO



Contaminazione dell'ambiente di cantina, attrezzature e superfici:

- impiego di ozono gassoso;
- acqua ozonizzante.

Contaminazione del vino in affinamento:

- impiego di chitosano di origine fungina;
- anidride solforosa;
- filtrazione con appositi setti filtranti.

Ozono, in forma gassosa o in mezzo acquoso

- Agente sanitizzante delle attrezzature di cantina, serbatoi, barrique;
- azione ossidante nei confronti di proteine, acidi nucleici, enzimi metabolici.
- acqua ozonizzata (3,5 mg/L) per 30 min inattivazione di *B. bruxellensis*

J Food Sci Technol
DOI 10.1007/s13197-017-2527-6



ORIGINAL ARTICLE

The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine

Raffaele Guzzon¹ · Manfred Bernard² · Chiara Barnaba¹ · Daniela Bertoldi¹ · Konrad Pixner³ · Roberto Larcher¹

Innovative Food Science and Emerging Technologies 47 (2018) 309–316



Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodsci



Control of *Brettanomyces bruxellensis* on wine grapes by post-harvest treatments with electrolyzed water, ozonated water and gaseous ozone



Francesco Cravero^{a,1}, Vasileios Englezos^{a,1}, Kalliopi Rantsiou^a, Fabrizio Torchio^b, Simone Giacosa^a, Susana Rfo Segade^a, Vincenzo Gerbi^a, Luca Rolle^a, Luca Coccolin^{a,*}



G.R.A.P.E.

STRATEGIE DI CONTROLLO
LOCALI E ATTREZZATURE CANTINA



1. **Ozono** in mezzo acquoso (generatore da 20 g/h)

- Attrezzature di cantina: cassette di raccolta, pressa, pompe, tubazioni, pigiadiraspatrice, serbatoio, superfici.

2. **Ozono** gassoso (generatore da 5 g/h)

- Barriques, Tonneaux

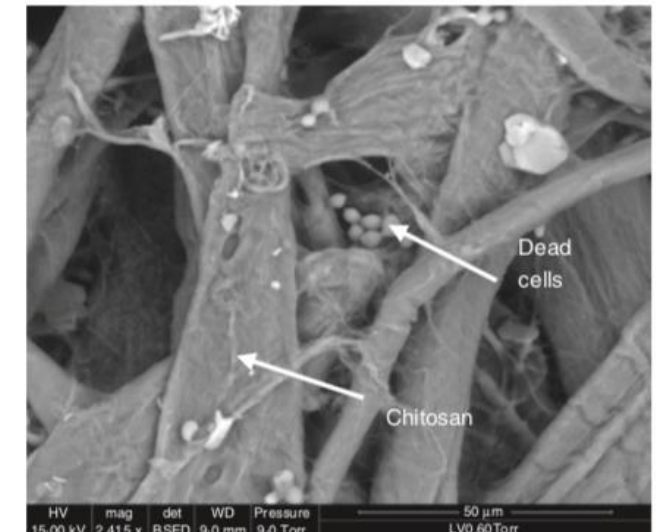
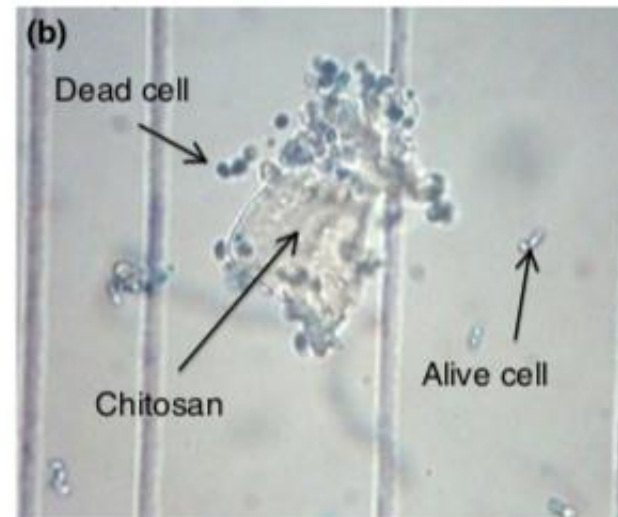
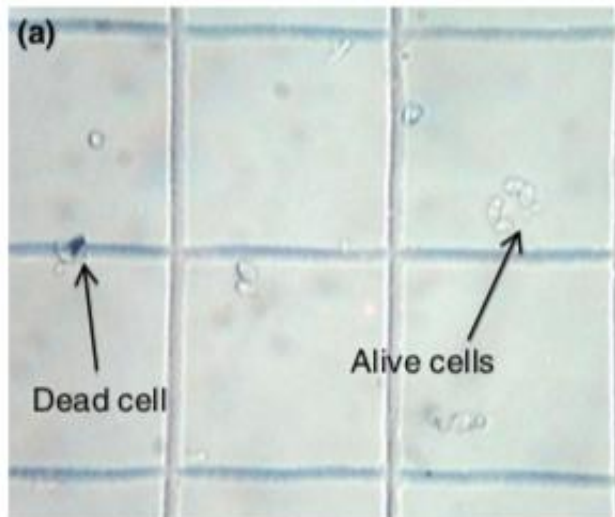


G.R.A.P.E.

STRATEGIE DI CONTROLLO VINO IN AFFINAMENTO

Chitosano, polisaccaride derivato N-deacetilato della chitina di origine fungina

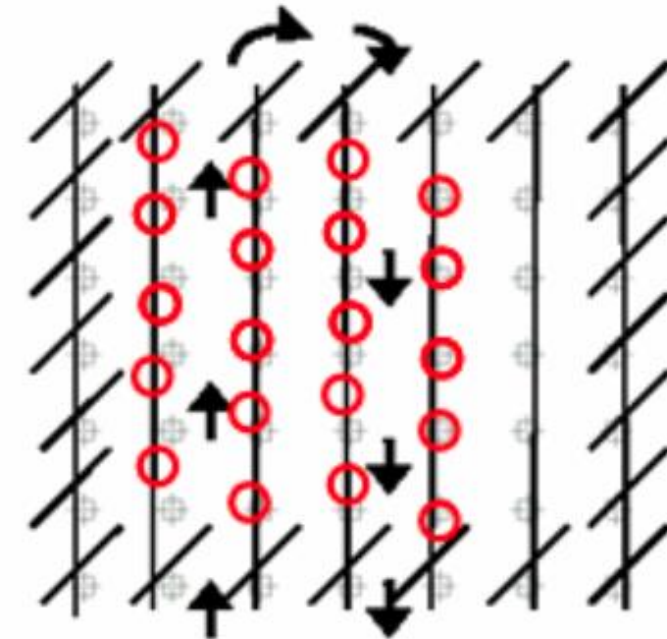
- Influisce sull'integrità delle membrane cellulari con arresto delle attività metaboliche, limita diffusione di soluti essenziali, aggregazione cellulare;
- L'efficacia dipende dal grado di deacetilazione, temperatura, pH
- prolungamento della fase lag, MIC 0,2-0,5 mg/L;



CAMPIONAMENTO IN VIGNETO:



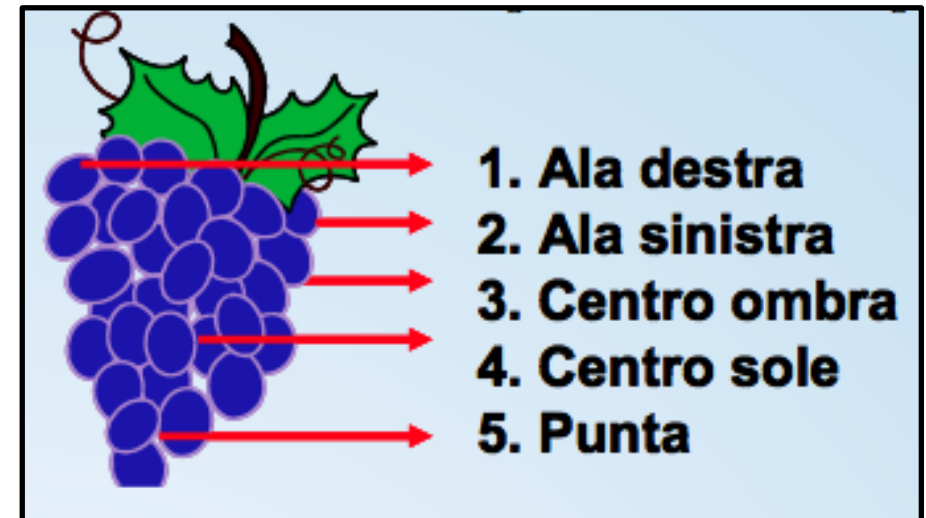
- 4 interfilari
- 5 acini per ogni grappolo (80 grappoli)
- TOTALE 400 acini



CAMPIONAMENTO IN VIGNETO:



- 4 interfilari
- 5 acini per ogni grappolo (80 grappoli)
- TOTALE 400 acini



Concentrazione di *B. bruxellensis* in uve pressate

San Felo (cv. Cabernet Sauvignon)

Settimana	Vigneto trattato (Log UFC/ml \pm DS)	Controllo (Log UFC/ml \pm DS)
1	<1	<1
2	<1	<1
3	<1	<1
4	<1	<1
5	<1	<1
6	<1	<1

Cacciagrande (cv. Petit Verdot)

Settimana	Vigneto trattato (Log UFC/ml \pm DS)	Controllo (Log UFC/ml \pm DS)
1	<1	<1
2	1,20 \pm 0,11	<1
3	<1	<1
4	<1	<1
5	<1	<1
6	<1	1,53 \pm 0,14

Concentrazione di *B. bruxellensis* in uve pressate

Val di Toro
(cv. Sangiovese)

Settimana	Vigneto trattato (Log UFC/ml ± DS)	Controllo (Log UFC/ml ± DS)
1	<1	1,03 ± 0,24
2	1,03 ± 0,28	1,44 ± 0,02
3	<1	<1
4	<1	<1
5	<1	<1
6	<1	1,34 ± 0,16

Val delle Rose
(cv. Cabernet Sauvignon)

Settimana	Vigneto trattato (Log UFC/ml ± DS)	Controllo (Log UFC/ml ± DS)
1	<1	<1
2	<1	1,42 ± 0,02
3	<1	<1
4	<1	<1
5	1,01 ± 0,13	<1
6	1,57 ± 0,10	1,92 ± 0,08



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE



Ricerca di *B. bruxellensis* tramite SAS (Surface Air System)





G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE



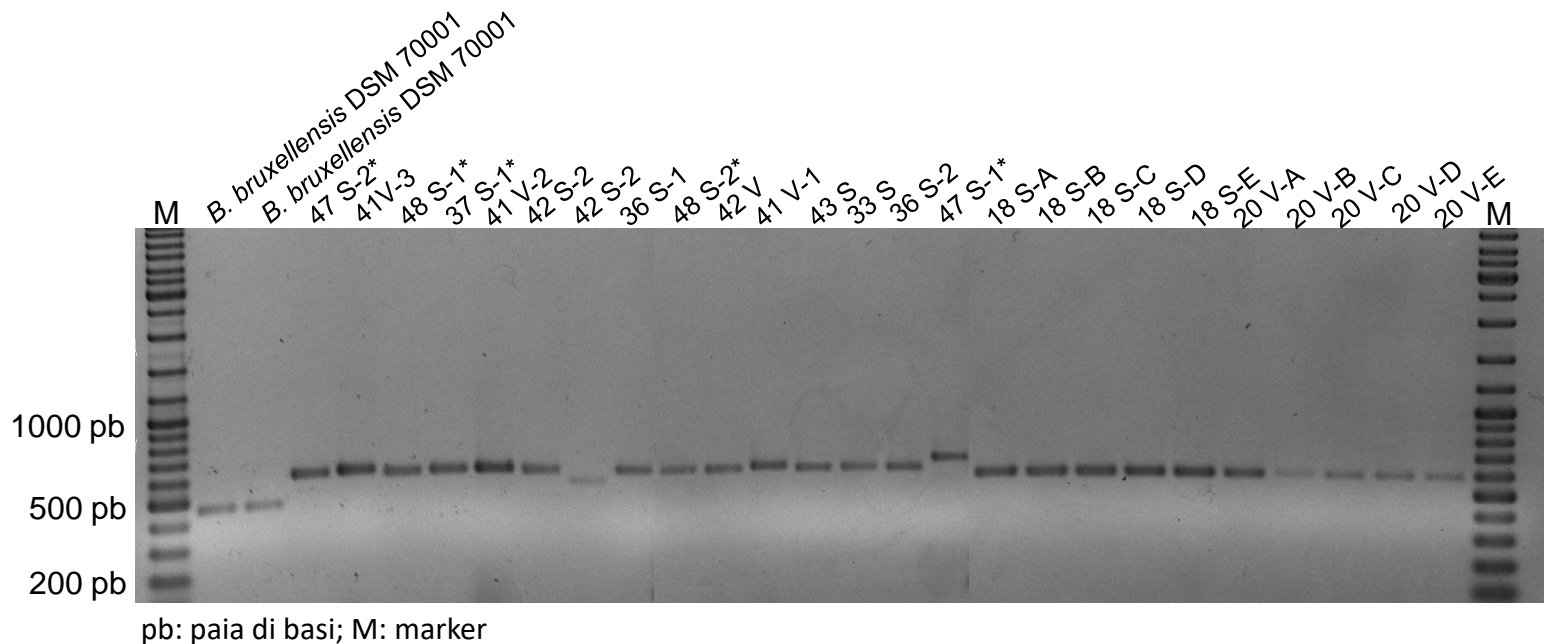
Ricerca di *B. bruxellensis*

Origine isolati	Codice
Vigneto	41 V-3; 41 V-2; 42 V; 41V-1; 20 V-A; 20 V-B; 20 V-C; 20 V-D; 20 V-E
Serbatoio	47 S-2*; 43 S; 47 S-1*
Pompa follatore	48 S-1*; 48 S-2*;
Pigiadiraspatrice	37 S-1*; 33 S; 18 S-A; 18 S-B; 18 S-C; 18 S-D; 18 S- E
Pompa	42S-1; 42 S-2; 34 S;
Pompa rimontaggio	36 S-1; 36 S-2
Aria	NR**

*campionamento dopo sanificazione con ozono

** non rilevato

Amplificazione regione 5.8S-ITS degli isolati





G.R.A.P.E.

Brettanomyces bruxellensis
Mosti in fermentazione



PRELIEVO IN VASCA:

- Rimescolamento e omogeneizzazione della massa.
- Prelievo da assaggiavino previa sanificazione con soluzione di metabisofito di potassio (5 g/l) e scorrimento per alcuni secondi del vino;
- prelievo di 500 ml di campione in contenitore sterile.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Mosti in fermentazione



San Felo

Descrizione campione	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)
Metà fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fiore	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Pressato	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Metà malolattica	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine malolattica	<1	<10	<10	<1	<10	<10

*Vinificazione uve del vigneto trattato dopo sanificazione con ozono delle attrezzature.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Mosti in fermentazione



Cacciagrande

Descrizione campione	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)
Metà fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fiore	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Pressato	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Metà malolattica	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine malolattica	<1	68	<10	<1	32	<10

*Vinificazione uve del vigneto trattato dopo sanificazione con ozono delle attrezzature.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Mosti in fermentazione



Val di Toro

Descrizione campione	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)
Metà fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fiore	<1	ND	ND	1,44 \pm 0,05	ND	ND
Pressato	<1	ND	ND	1,35 \pm 0,02	ND	ND
Metà malolattica	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine malolattica	<1	<10	<10	<1	<10	<10

*Vinificazione uve del vigneto trattato dopo sanificazione con ozono delle attrezzature.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Mosti in fermentazione



Val delle Rose

Descrizione campione	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)
Metà fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fine fermentazione	<1	ND	ND	<1	ND	ND
Fiore	<1	ND	ND	2,26 \pm 0,01	ND	ND
Pressato	<1	ND	ND	3,35 \pm 0,03	ND	ND
Metà malolattica	<1	ND	ND	1,98 \pm 0,03	ND	ND
Fine malolattica	<1	<10	<10	1,43 \pm 0,07	175	34

*Vinificazione uve del vigneto trattato dopo sanificazione con ozono delle attrezzature.

PRELIEVO IN BARRIQUE:

ATTREZZATURE ED APPARECCHIATURE

- Contenitori sterili da 500 ml.
- Asta in acciaio inox per batonnage.
- Alzavino (“ladro”).
- Soluzione di metabisolfito di potassio (5 g/l).
- Flambatore.
- Frigorifero per il trasporto





G.R.A.P.E.

Brettanomyces bruxellensis
Vino in affinamento



PRELIEVO IN BARRIQUE:

- Rimescolare la massa di vino al fine di renderla omogenea mediante l'impiego di asta in acciaio inox per batonnage;
- mediante alzavino ("ladro") prelievo di 500 ml di vino in contenitore sterile.

Prima delle fasi di mescolamento/prelievo e nel caso del prelievo di più campioni, è opportuno pulire le attrezzature impiegate mediante l'utilizzo di una soluzione di metabisolfito di potassio e successivamente risciacquare abbondantemente con acqua.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Vino in affinamento



San Felo

Mese	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)
Dicembre	<1	<10	<10	<1	<10	<10
Gennaio	<1	<10	<10	<1	<10	<10
Febbraio	<1	<10	<10	<1	<10	<10

*Barrique sanificata con ozono.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Vino in affinamento



Cacciagrande

Mese	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)
Gennaio	<1	13	<10	<1	14	<10
Febbraio	<1	35	<10	<1	71	<10

*Vasca acciaio sanificata con ozono.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Vino in affinamento



A Tentamus Company

Val di Toro

Mese	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml \pm DS)	4-EF (μ g/l)	4-EG (μ g/l)
Gennaio	<1	13	<10	1,44 \pm 0,08	14	<10
Febbraio	<1	35	<10	2,12 \pm 0,06	107	<10

*Barrique sanificata con ozono.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Vino in affinamento



Val delle Rose

Mese	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)
Gennaio	1,11 ± 0,01	105	<10	1,00 ± 0,26	179	26
Febbraio	<1	116	<10	<1	91	<10

*Barrique sanificata con ozono.



G.R.A.P.E.

MONITORAGGIO

Vino in affinamento



A Tentamus Company

Val di Toro

Trattamento con Chitosano (10 g/hl)

Mese	Trattato*			Controllo		
	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)	<i>B. bruxellensis</i> (Log UFC/ml ± DS)	4-EF (µg/l)	4-EG (µg/l)
Gennaio	<1	13	<10	1,44 ± 0,08	14	<10
Febbraio	<1	35	<10	2,12 ± 0,06	107	<10
Maggio	3,15	655	189	1,06 ± 0,07	218	48
Giugno	< 1	748	223	< 1	236	62

Filtrazione a 0,45 µm

*Barrique sanificata con ozono.

Conclusioni

✓ VIGNETO:

- presenza sporadica e disomogenea del *B. bruxellensis*
- trattamenti fitosanitari utilizzati apparentemente ininfluenti
- Modalità di campionamento?

✓ LOCALI E ATTREZZATURE:

- Monitoraggio non significativo
- Azione positiva della sanificazione con acqua ozonizzata

Conclusioni

✓ MOSTI IN FERMENTAZIONE:

- Sviluppo di *B. bruxellensis* a partire dalla svinatura

✓ VINI IN AFFINAMENTO:

- Azione positiva della sanificazione con ozono gassoso nel breve periodo
- Azione del chitosano apparentemente non risolutiva
- Azione della filtrazione apparentemente risolutiva



 A Tentamus Company

Grazie per l'attenzione!