

L'ESAME MICROSCOPICO IN ENOLOGIA

Annibale Gandini

Il prof. R. E. Kunkee, docente di enologia all'Università di California, definisce, in termini inconsueti e provocatori, buon enologo "an enologist who has ready access to a first class microscope and uses it". In effetti, a ben considerare, il tecnico che opera in cantina ha fra i suoi compiti fondamentali quello di gestire i fenomeni microbiologici che si susseguono nella vita del vino e per fare ciò è essenziale l'uso (frequente) di un buon microscopio. Già nel 1982 l'Assemblea Generale dell'Office International de la Vigne et du Vin auspicava che si dedicasse la massima attenzione ai controlli microbiologici dei vini nel corso dell'intero ciclo di elaborazione - dal mosto al prodotto in bottiglia - al fine di garantirne la **stabilità biologica** e la qualità.

Nella realtà attuale bisogna riconoscere che negli stabilimenti enologici, con le dovute eccezioni, il ricorso al microscopio, ammesso che sia presente, non è molto frequente, specialmente se confrontato con l'uso di più o meno sofisticati accertamenti analitici. Eppure esso è strumento facile da usare, relativamente poco costoso, che fornisce indicazioni immediate sulla presenza, l'entità numerica, la morfologia e lo stato fisiologico dei microrganismi e suggerisce accertamenti ed interventi tempestivi e mirati.

Il microscopio

Inventato da Galileo all'inizio del Seicento ha conosciuto enormi progressi. Ne esistono numerosissime tipologie e per tutte le borse: dai "giocattoli" di basso prezzo e scadenti prestazioni sino ai costosissimi strumenti elettronici, a trasmis-

sione o a scansione, riservati alla ricerca scientifica.

Per l'impiego enologico è sufficiente un buon **microscopio ottico** da laboratorio con almeno tre obiettivi, capaci di 10, 40 e 100 ingrandimenti, oculare micrometrico 10 X, condensatore, diaframma, lampada di illuminazione di intensità variabile, viti macro e micrometrica, tavolino traslatore. Il corredo per l'osservazione in **contrasto di fase** non è indispensabile, ma il suo costo è compensato dalla possibilità di osservare distintamente le cellule batteriche senza ricorrere a colorazioni.

Prelievo del campione

Prima di procedere all'esame microscopico bisogna effettuare correttamente, con pipette o anse sterili, il prelievo del campione. Questo può avvenire in superficie, o dal deposito, o previa agitazione della bottiglia oppure dopo aver reso omogenea la massa presente nei contenitori di maggiori dimensioni. In caso di cariche microbiche inferiori alle 100.000 cellule per mL occorre procedere alla **centrifugazione** del campione e, dopo eliminazione del surnatante, si mescola il deposito col poco liquido residuo al fondo del tubo da centrifuga. Nei limiti del possibile vanno rispettate le condizioni di **asepsi** e l'**osservazione** dev'essere **immediata**. Per accelerare lo sviluppo microbico nel vino in esame si possono eseguire i tradizionali **saggi di stabilità**: all'aria per almeno tre giorni in recipiente sciolmo oppure per lo stesso tempo in contenitore chiuso con valvola, mantenuto a 30°C.

Preparati in goccia schiacciata

Sono i più semplici e frequenti, si allestiscono deponendo una goccia di vino o mosto su un vetrino portaoggetti e lo si copre con un vetrino coprioggetti. Si sistema il tutto sul tavolino del microscopio e si procede alla messa a fuoco, prima con l'ingrandimento minore, col quale si cerca una zona del preparato interessante, e poi con i successivi. Per l'osservazione dei lieviti sono sufficienti 4-500 ingrandimenti mentre per i batteri conviene raggiungere i 1000, spesso previa **colorazione**. Se si desidera conservare a lungo i preparati a goccia schiacciata, per evitarne l'evaporazione, occorre

sigillare i bordi del coprioggetti: si prestano egregiamente gli smalti per unghie.

Vediamo ora cosa è possibile trovare in un preparato di vino o mosto osservato al microscopio.

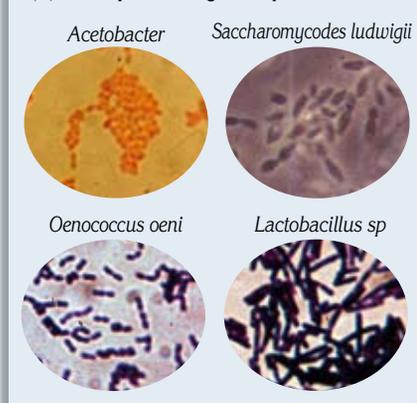
Lieviti

Nella maggioranza dei casi sono le forme prevalenti nel campo di osservazione in quanto normali abitatori di qualunque mosto o vino non sottoposti a processi di stabilizzazione microbiologica. Una rilevante presenza di cellule lievitiformenti caratterizza i mosti in fermentazione, i prodotti della svinatura, i vini in rifermentazione o florizzazione o soggetti all'alterazione della fioretta. Siccome la maggioranza dei lieviti vinari, e fra questi *Saccharomyces cerevisiae*, presentano cellule da rotonde ad ovali più o meno allungate, di dimensioni comprese fra i 4-6 x 6-8 micron, il semplice esame microscopico consente l'individuazione specifica solo in pochi casi. Fra questi si può citare *Candida stellata*, con cellule molto piccole ed in **aggregati "a stella"**, caratteristica dei mosti da uve bottrizzate, oppure di *Saccharomyces ludwigii* dalle **grosse** cellule **apiculate** od a suola di scarpa, tipico di mosti o vini abbondantemente solfitati. Più spesso si può ipotizzare il genere in base alla forma delle cellule: **apiculata piccola** in *Kloeckera* ed *Hanseniaspora*, iniziatrici del processo fermentativo spontaneo; **ogivale** in *Brettanomyces/Dekkera*, temibili cause di odori sgradevoli nei vini.

La modalità di moltiplicazione per **scissione** è esclusiva del genere *Schizosaccharomyces*, con specie dotate di elevata capacità maloalcolica, mentre la formazione di **pseudomicelio** (cellule in catene variamente ramificate) caratterizza, nei vini, specie dei generi *Pichia* e *Candida*, agenti della **fioretta**.

L'osservazione di **aggregati** cellulari o di fenomeni sessuali può condurre al genere *Zygosaccharomyces*, le cui specie osmofile possono inquinare mosti concentrati (*Z. rouxii*) o vini con residuo zuccherino (*Z. bailii*) oppure *Torulasporea delbrueckii*, dal metabolismo particolarmente puro. *Metschnikowia pulcherrima*, infine, fra gli iniziatori della fermentazione spontanea, è riconoscibile per la presenza di un **grosso vacuolo sferico**, che occupa quasi per in-

(A) - Esempi di microrganismi presenti nel vino



tero il lume cellulare. L'occhio esperto può desumere una buona indicazione della vitalità delle cellule dalla frequenza delle forme gemmanti e dall'aspetto del citoplasma: ialino, omogeneo nelle cellule attive, mentre risulta granuloso o contratto in quelle quiescenti o morte.

Batteri

È praticamente impossibile che un mosto od un vino (non stabilizzato) non ospitino cellule batteriche, data l'enorme diffusione di questi microrganismi in natura e l'esistenza di alcuni gruppi in grado di sopportare le condizioni avverse del vino. Sono però superate le **concezioni pasteuriane** secondo le quali la presenza di batteri nel vino era sinonimo di alterazione: se il numero di cellule è limitato ed il vino è sufficientemente robusto, non c'è motivo di preoccupazione. Se invece i batteri si presentano numerosi, il vino è debole (bassa acidità, poco alcolico, senza solforosa) e le condizioni di conservazione sono inadatte (alta temperatura, presenza di ossigeno) allora è opportuno prendere provvedimenti idonei a difendere la nostra bevanda. A causa delle piccolissime **dimensioni**, spesso **inferiori al micron**, e di un certo **polimorfismo** non è facile individuare al microscopio i batteri del vino: a forme abbastanza simili corrispondono talora comportamenti assai diversi. L'esperienza è certamente di aiuto, ma per la sicura identificazione, come d'altronde nel caso dei lieviti, sono necessari l'**isolamento** ed il successivo studio delle caratteristiche fisiologiche e biochimiche. Recentemente sono stati messi a punto metodi di identificazione, basati sulla biologia molecolare, coltura-indipendenti, ma per ora sono riservati a specialisti. Se non si dispone di un microscopio a contrasto di fase, per un migliore esame della morfologia batterica è opportuno procedere a una colorazione semplice o, meglio ancora, alla **colorazione** diagnostica di **Gram**, la quale permette di differenziare, grazie alla diversità di struttura e composizione della parete cellulare, i due grandi gruppi di batteri presenti nei vini: i lattici e gli acetici. Nell'ambito dei **batteri lattici** si possono osservare cellule rotondeggianti oppure bastoncellari. Le prime, abbinate o in **catenelle**, caratterizzano i più apprezzati agenti della fermentazione malolattica (oggi attribuiti alla specie *Oenococcus oeni*), mentre si presentano in **tetrad**i i *Pediococcus*, per lo più agenti di spunto lattico. Anche le **forme a bastoncino** (*Lactobacil-*

lus), più o meno allungate e spesso catenulate, sono in grado di fermentare l'acido malico, ma solo a pH superiori a 3.5, quando il fenomeno non è generalmente auspicabile. Purtroppo sono assai attivi sugli zuccheri e talora sull'acido tartarico e la glicerina, con conseguenze nefaste per la qualità del vino. L'abbondante riscontro di batteri lattici conferma l'impressione visiva nella diagnosi del filante e del deposito cotonoso. Gli *Acetobacter*, indispensabili per la produzione di aceto, sono sempre dannosi per i vini e, rispetto ai lattobatteri, più resistenti ai fattori avversi. Morfologicamente sono **assai variabili**: si va da forme bastoncellari molto tozze, abbinate o catenulate, di dimensioni maggiori dei cocchi lattici, a forme degenerative filamentose ed irregolari.

Microfunghi

Il vino, grazie alla presenza dell'alcol, non consente attività fungine. Nei mosti è invece possibile osservare la presenza e lo sviluppo di miceti, provenienti da uve attaccate da parassiti o saprofiti oppure dall'inquinamento da parte di recipienti o attrezzature. La presenza di microfunghi è riconoscibile dall'osservazione di **frammenti di micelio**, tubuli di varia lunghezza, settati nella maggior parte dei casi, privi di setti nei *Mucore* e nei *Rhizopus*. Ben più utili per la diagnosi sono gli **organi di moltiplicazione**, rappresentati da conidiofori e conidi, che caratterizzano, oltre ai succitati, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, di interesse tutt'altro che trascurabile in quanto, oltre consumare zuccheri ed altri principi nutritivi, elaborano sostanze organoletticamente sgradevoli, producono enzimi ossidanti a carico dei polifenoli, sostanze ad azione antibiotica e, in alcuni casi, micotossine. Numerose specie fungine (la più frequente è risultata *Monilia sitophila*) sono state osservate al microscopio su turaccioli di sughero ove possono causare gusti ed odori anomali.

Depositi abiotici

Per completezza di informazione occorre ricordare che il microscopio permette di osservare, oltre ai microrganismi, qualunque particella in sospensione nel vino o che ne costituisce il deposito. In particolare l'esame microscopico può mettere in evidenza:

⇒ sostanze cristalline di forma diversa (tartrati, bitartrati, mannite...);

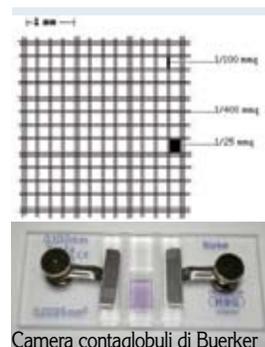
⇒ aggregati di micelle colloidali (proteine, polifenoli, precipitati ferrici e rameosi);

⇒ ausiliari di filtrazione o chiarificazione (fibre cellulose, farina fossile, perlite, bentonite, polivinilpirrolidone, carbone, chiarificanti proteici ecc.).

Opportuni saggi chimici sui precipitati permettono di individuarne con certezza la natura.

Il conteggio delle cellule

Volendo quantificare l'entità della popolazione microbica per trarne indicazioni sugli eventuali interventi tecnologici da effettuare, occorre procedere al conteggio delle cellule. Prescindendo dai metodi classici di disseminazione su substrati solidificabili, dai costosi sistemi elettronici e pure dalla filtrazione attraverso membrane microporose seguita da osservazione in epifluorescenza, ce la si può cavare in meno di mezz'ora ricorrendo alle **camere contaglobuli** (tipo Buerker o Thoma).



Camera contaglobuli di Buerker

Si tratta di spessi vetrini portaoggetti al centro dei quali sono scavate e delimitate da un reticolo tante cellette di volume noto, che facilitano il conteggio, soprattutto dei lieviti, perché le cellule batteriche sono difficilmente rilevabili. Se si desidera un'indicazione delle

cellule viventi si può diluire la sospensione di lieviti con blu di metilene allo 0,2%: dopo pochi minuti le cellule morte, avendo perso la permeabilità selettiva della membrana, si colorano in blu.

Le più frequenti applicazioni del conteggio diretto delle cellule microbiche sono il **monitoraggio** dell'andamento delle **fermentazioni** e delle **rifermentazioni** nonché la determinazione del volume di **colture starter** da inoculare per provocare i processi fermentativi.

Nel caso di mosti appena spremuti la popolazione lievitifforme è normalmente superiore a 10^4 cellule/mL: se supera le 10^6 è indice di un inizio di fermentazione. Se il processo fermentativo decorre in condizioni ottimali le cellule di lievito possono superare i 100 milioni per mL e se si è usato un valido starter di *S. cerevisiae*, presentano, in grandissima maggioranza, forma ellittica.