RÉSOLUTION OENO 15/2003

BACTERIES LACTIQUES

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'Article 5, alinéa 4 de la Convention internationale d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins du 13 octobre 1954,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE de remplacer dans le Codex œnologique international, la monographie existante par la monographie suivante dans ledit Codex :

BACTERIES LACTIQUES

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Les bactéries lactiques sont utilisées en œnologie pour effectuer la fermentation malolactique. Elles doivent appartenir aux genres Oenococcus (*Leuconostoc), Lactobacillus et Pediococcus* et doivent avoir été isolées des raisins, des moûts ou des vins ou des cultures issues du croisement de ces mêmes bactéries (cultures mères originelles) qui doivent être conservées en condition de stabilité génétique.

L'obtention et l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées (O.G.M.) doivent avoir fait l'objet d'une autorisation préalable d'une autorité compétente.

Une bactérie lactique utilisable en œnologie doit donc transformer l'acide malique du moût ou du vin en acide lactique et en dioxyde de carbone, ne doit produire des amines biogènes qu'en quantités les plus faibles possibles, et ne doit pas donner de faux goûts ni produire des substances nuisibles à la santé humaine.

2. ETIQUETAGE

Doivent figurer sur l'étiquette:

- Le nom du genre et de l'espèce ainsi que la référence de(s) la souche(s) attribuée(s) par un organisme officiel d'enregistrement des microorganismes ou par des instances internationales, le sélectionneur, l'origine, le sélectionneur de la souche et éventuellement l'auteur qui l'a isolée

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Le mode d'emploi ou la méthode de réactivation et les éventuels additifs préconisés par le fabricant.
- Le nombre de cellules revivifiables par gramme de préparation qui est garanti par le fabricant, la perte de viabilité par mois de conservation dans des conditions définies de température, d'humidité et d'aération, le numéro du lot ainsi que la date limite d'utilisation et les conditions de conservation.
- L'indication que les bactéries lactiques ont été obtenues par modifications génétiques ainsi que le caractère modifié si cela est le cas.

3. CARACTERES

Elles sont utilisées, soit sous forme liquide, soit sous forme congelée, soit sous forme de poudre obtenue par lyophilisation ou séchage, en culture pure ou en association de cultures pures.

4. LIMITES ET METHODES D'ESSAIS

4.1. Humidité

Mesurée par la perte de poids de 5 g de produit, séché à 105°C jusqu'à poids constant (environ 3 heures)

La teneur maximale doit être inférieure à 8 %.

4.2. Métaux lourds

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure à 10 mg/kg de matière sèche, exprimée en plomb.

4.3. Plomb

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure à 5 mg/kg de matière sèche.

4.4. Mercure

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

international

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.5. Arsenic

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international

La teneur doit être inférieure 3 mg/kg de matière sèche.

4.6. Cadmium

Procéder au dosage selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international.

La teneur doit être inférieure 1 mg/kg de matière sèche.

4.7. Mycotoxines [1]

4.8. Bactéries lactiques revivifiables

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).

Le nombre doit être supérieure ou égale à 10^8 UFC/g ou 10^7UFC/ml.

4.9. La teneur en cellules revivifiables de bactéries lactiques d'une espèce différente de ou des souches indiquées [2]

4.10. Moisissures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).

Le nombre doit être inférieur à 10^3UFC/g de poudre.

4.11. Bactéries acétiques contaminantes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).

Le nombre doit être inférieure à 10^3 UFC/g de poudre ou 10^3 UFC/ml. La somme *Acetobacter* + *Gluconobacter* doit être inférieure à 10^3 UFC/g de poudre ou 10^3 UFC/ml.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

4.12. Levures

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).
Le nombre de cellules revivifiables de levures contaminantes (comme par exemple *Shizosaccharomyces* ou *Brettanomyces*) total doit être inférieur à 10^3 UFC/g de poudre ou 10^3 UFC/ml.

4.13. Salmonelles

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 25 g.

4.14. Pseudomonas aeruginosa[3]

4.15. Escherichia coli

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.16. Staphylocoques

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).
L'absence doit être contrôlée sur un échantillon de 1 g.

4.17. Coliformes

Procéder au dénombrement selon la méthode figurant au chapitre II du Codex œnologique international (méthode en annexe de la présente résolution).
Le nombre doit être inférieur à 10 UFC/g.

5. ADDITIFS

Ils doivent être conformes aux réglementations en vigueur.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

6. CONSERVATION

Ne pas conserver en conditionnement ouvert et/ou à des températures supérieures à 10 °C.

Les conditions de conservation différeront selon les modes de préparation et de conditionnement.

Dans tous les cas, se référer aux prescriptions du fabricant.

Méthodes d'analyse microbiologiques

(à faire figurer au chapitre II du Codex œnologique international)

1. Rehydration préalable des bactéries

- Peser stérilement 1 g de bactéries lactiques,
- Ajouter stérilement 100 ml d'eau stérile à température ambiante (25 °C)
- Homogénéiser à l'aide d'une plaque magnétique pendant 5 mn
- Laisser ensuite pendant 20 mn toujours à température ambiante (20 °C)
- Homogénéiser ensuite pendant 5 mn à température ambiante (20 °C)
- Prélever stérilement 10 ml et procéder aux contrôles microbiologiques.

2. Détermination du nombre de bactéries lactiques revivifiables.

2.1. Milieu MTB/s agar

Composition:

Glucose : 15 g

Peptone : 8 g

Extrait de levure : 5g

Hydrolysat de caséine : 1 g

Jus de tomate : 20 ml

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

Acétate de Na: 3 g
Citrate de NH_4 : 2 g
Acide malique : 6 g
Sulfate de Mg : 0,2 g
Sulfate de Mn 0,035 g
Tween 80 1 ml
TC Vitamine minimal Eagl : 10 ml
après la stérilisation
ajuster pH 5,0 et ajouter
Agar : 2%
Eau : q.s.p 1000 ml
Sorbate de potassium (400 mg/l de milieu liquide) ou
Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimaricine à 25% m/v
Stérilisation à 120 °C pendant 20mn
Incuber en anaérobie pour contraster les moisissures à 25 °C, pendant 8 à 10 jours.

2.2. Milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS)

Les bactéries sont cultivées dans un milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe 1960) dont la composition est la suivante :
Agar agar: 15 g
Bacto-peptone: 10 g
Extrait de viande : 10 g
Extrait de levure : 5 g
Acétate de sodium : 5 g
K_2 HPO_4 : 2 g
Citrate trisodique : 2 g
$MgSO_4$ à 100 mg/l : 2,5 ml
$MnSO_4$ à 20 mg/l: 2 ml
Tween 80 1 ml
Acide DL malique : 5 g
Jus de tomate concentré* : 20 ml
Glucose : 20 g

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
© OIV 2003

Ajuster (HCl ou NaOH)pH : 4,8

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

Autoclavage à 120 °C pendant 20 mn

Sorbate de potassium (400 mg/l de milieu liquide) ou

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimaricine à 25% m/v

incubation à 25 °C pendant 8 à 10 jours en anaérobiose

*le jus de tomate est destiné à améliorer la croissance des bactéries lactiques.

préparation : prendre un jus de tomate en conserve contenant au moins 7 g/l de NaCl (maxi 9 g/l)

centrifuger à 4000 g pendant 20 mn;

recueillir le jus clair et le filtrer sur papier filtre ;

autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

3. Moisissures

milieu Czapeck-Dox/s gélosé

Composition :

Agar agar: 15 g

Saccharose: 30 g

$NaNO_3$: 3 g

K_2HPO_4: 1 g

$MgSO_4$: 0,5 g

KCl: 0,5 g

$FeSO_4$: 0,01 g

Sorbate de potassium : 0,4 g

Eau : q.s.p. 1000 ml

Ajuster : pH 3,5

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Ajouter directement dans la boîte de petri 0,1 ml d'une Solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 10 jours

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

4. Bactéries acétiques contaminantes

4.1. Bactéries acétiques contaminantes

Milieu Act/s agar

Composition:

Agar agar bactériologique : 20 g

Extrait de levure : 5 g

Acides aminés de caséine : 5 g

Glucose: 10 g

Ajuster à pH 4,5

Eau q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Incuber en aérobie, 25 °C, pendant 7 jours

Sorbate de potassium (400 mg/l de milieu liquide) ou

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimaricine à 25% m/v

4.2. Pour la recherche de *Acetobacter*

Milieu Acb/s agar

Composition

Extrait de levure : 30 g

Alcool 95% vol. : 20 ml

Vert de bromocrésol (sol. 2,2%) : 1 ml

Agar : 2%

Eau : q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,1 ml d'une Solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimaricine à 25% m/v

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

4.3. Pour la recherche de *Gluconobacter*

Milieu Gcb/s agar

Composition

autolysat de levure : 10 g

glucose : 3 g

$CaCO_3$: 3 g

Agar : 2%

Eau : q.s.p. 1000 ml

Stérilisation à 120 °C pendant 20 mn

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,1 ml d'une Solution de pénicilline à 0,25% dans l'alcool pur

Ajouter directement dans la boite de Pétri 0,2 ml d'une solution hydroalcoolique de pimaricine à 25% m/v

(le $CaCO_3$ facilite la reconnaissance des colonies de *Gluconobacter* qui le dissout en produisant une zone circulaire plus claire autour de la colonie)

Incuber en aérobie à 25 °C pendant 7 jours

5. Dénombrement des Levures

5.1. Milieu YM agar (MALT WICKERHAM)

Composition :

Agar agar bactériologique :15 g

Extrait de levure : 3 g

Extrait de malt : 3 g

Peptone : 5 g

Glucose : 10 g

Eau : q.s.p. 1000 ml

préalablement à l'emploi, le milieu est mis à autoclaver à 120 °C pendant 20 mn.

Après ensemencement, les boites sont mises à incuber à 25 °C en anaérobiose pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC et rapporter au poids de matière sèche.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

5.2. Milieu YMS agar

Composition :

Gélose : 20 g

Glucose : 20 g

Extrait de levure : 5 g

Extrait de malt : 3 g

Peptone : 2 g

Acide malique : 4 g

Jus de raisin : 100 ml

Complexe de vitamines* : 1%

Eau : q.s.p. 1000 ml

préalablement à l'emploi, le milieu est mis à autoclaver 120 °C pendant 20mn

Après ensemencement, les boites sont mises à incuber à 25 °C en anaérobiose pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC et rapporter au poids de matière sèche.

* Complexe de vitamines (inositol 25 mg, biotine 0,02 mg, pantothenate de Ca 4 mg, acide folique 0,002 mg, nicotinamide 4 mg, acide paraminobenzoique 2 mg, pyridoxine chlorhydrate 4 mg, riboflavine 2 mg, thiamine 10 mg, eau q.s.p. 1000)

5.3. Milieu OGA

Composition :

Extrait autolytique de levure : 5 g

Glucose : 20 g

Agar agar bactériologique : 15 g

Eau : q.s.p. 1000 ml

Autoclavage à 120 °C pendant 20 mn.

Après ensemencement, incubation en aérobiose à 25 °C pendant 48 à 72 heures.

Compter le nombre d'UFC et rapporter au poids de matière sèche.

6. Dénombrement des salmonelles

6.1. Principe

L'échantillon subit une phase de pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée 16 à

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

20H à 37°C. Suite à cette étape, une partie aliquote de ce bouillon est ensemencé dans un dispositif pour culture. Celui-ci contenant un milieu spécifique et 2 tubes spéciaux (constitués de deux parties) est incubé 24H à 41°C. Les S*almonella* migrent de la partie inférieure (milieu sélectif) vers la partie supérieure du tube (milieu indicateur). La présence de *Salmonella* se traduit par un changement de coloration de cette dernière.

6.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture et les diverses préparations sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen. Le matériel souillé est soumis à une destruction par autoclave 1H à 120 °C ou par immersion dans l'eau de Javel pendant 18H au minimum (cf procédure de nettoyage).

- Éprouvette en verre stérile de 125 ml
- Sac stomacher stérile.
- Barrette de fermeture.
- Stomacher.
- Tubes stériles en verre 16x160 mm.
- Tubes à essais en verre 20x220 cotonnés.
- Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
- Pipettes stériles en matière plastique de 10 ml graduées en 0,1 ml.
- Agitateur de tubes.
- Dispositif pour culture à réhydrater.
- Une seringue stérile en matière plastique de 2 ml avec une aiguille stérile.
- Pince brucelle.
- Clé pour dévisser les tubes A et B du dispositif de culture.
- Lame de verre propre.
- Pipettes Pasteur cotonnées stériles.
- Öse.
- Étuve à 41 °C ± 1 °C.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Étuve à 37 °C ± 1 °C.
- Bec Bunsen.

6.3. Réactifs

- Eau peptonée stérile (EPT)
- Eau distillée stérile (EDS).
- Flacon stérile de 500 ml vissé prérempli avec 125 ml d'EPT .
- Flacon stérile de 500 ml vissé prérempli avec 225 ml d'EPT .
- Milieu spécial pour *Salmonella* :SRTEM.
- Disque de novobiocine (1,8mg de novobiocine).
- Gélose Hektoën (cf DOMIC-08).
- Galerie API 20E.
- Tubes de gélose TSAYE inclinée .
- Solution de NaCl stérile à 8,5 g/l
- Sérum anti *Salmonella.*

6.4. Mode opératoire

6.4.1. Préparation de la suspension mère

Elle diffère selon la nature des produits et le taux de dilution

Ajouter dans un sachet stomacher une prise d'essai de 25 gramme(s) ou millilitre(s) de produit à une quantité d'eau peptonée 9 fois supérieure

Fermer le sachet par thermosoudure ou à l'aide d'une barrette.

Broyer au stomacher pendant 1 minute.

6.4.1.1. Phase de pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide :

Incuber la suspension mère 16 à 20H à 37 °C ± 1 °C.

6.*4.1.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides*

Préparation du dispositif de culture

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Dévisser le couvercle du récipient pour culture ;
- Ajouter de l'EDS jusqu'à la ligne 1 marquée sur le corps du récipient.

Remarque : La base des tubes A et B doit être située sous le niveau de l'eau.

- Adapter l'aiguille à la seringue et s'assurer que le piston de la seringue est enfoncé (absence d'air) ;
- Introduire verticalement l'aiguille fixée à la seringue dans la pastille caoutchoutée au centre du bouchon du tube A (bouchon bleu) en s'assurant que l'aiguille soit visible sous ce bouchon ;
- Tirer délicatement sur le corps de la seringue jusqu'à ce que le liquide atteigne la ligne 3 marquée sur le corps du récipient.

Remarque : ne pas aspirer de liquide dans la seringue.
Cette opération doit prendre environ 5 secondes.

- Répéter l'opération pour le tube B (bouchon rouge) ;
- Bien revisser le bouchon du récipient de culture ;
- Appuyer le côté du récipient sur un agitateur de tube en le maintenant au moins 5 secondes.

Remarque : le liquide dans les tubes A et B doit être fortement agité.

- Laisser reposer le dispositif de culture au moins pendant 5 minutes **;**
- Dévisser le bouchon du récipient de culture et verser le milieu SRTEM jusqu'à ce que le niveau atteigne la ligne 2 marquée sur le corps du récipient ;
- Ajouter à l'aide d'une pince brucelle un disque de novobiocine ;
- Enlever les bouchons des tubes A (bleu) et B (rouge) à l'aide de la clé puis les jeter.

Remarque : éviter de toucher avec les mains les tubes ainsi que les parois internes du dispositif.
Inoculation du dispositif de culture

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Homogénéiser la culture de pré-enrichissement ;
- Identifier le dispositif de culture en notant le numéro d'analyse sur son couvercle ;
- Dévisser le couvercle.
- A l'aide d'une pipette de 2 ml introduire 1 ml de culture de pré-enrichissement dans le récipient de culture.
- Visser le couvercle sur le dispositif de culture.
- Noter la date et l'heure d'incubation.
- Incuber 24H □30 mn à 41 °C □ 1 °C en position strictement verticale.

6.4.2. Lecture et interprétation

Elle est réalisée en observant, à travers les parois du récipient, la partie supérieure des tubes A et B.

La présence éventuelle de *Salmonella* se caractérise par une modification de la couleur du milieu indicateur situé à la partie supérieure de l'un des 2 tubes ou des 2 tubes :

réaction	**Tube A**	**Tube B**
positive :	tous les degrés de coloration noire.	tous les degrés de coloration rouge ou noire
négative :	absence de coloration noire	absence de coloration rouge ou noire

Le ou les tube(s) présentant une réaction positive est ou sont soumis à un isolement sur gélose sélective.

- Sécher les boîtes de gélose Hektoën dans une étuve à 46 °C □ 1 °C jusqu'à disparitio complète des gouttelettes à la surface du milieu (couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas).
- Prélever une öse à la surface du milieu indicateur positif et l'inoculer dans 5 ml d'EPT, conditionnés dans un tube stérile en verre 16x160 mm, pour obtenir une

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

dilution de la culture.

- Procéder ainsi pour chacun des tubes positifs.
- Identifier la boîte en notant sur le couvercle le n° d'analyse ainsi que la lettre du tube en cours de confirmation.
- Homogénéiser la dilution de la culture, en prélever une öse
- Isoler à la surface de la gélose Hektoën de façon à permettre le développement de colonies isolées.
- Incuber 24H à 37 °C □ 1 °C.
- Sélectionner au moins 2 colonies isolées considérées comme typiques :

6.4.3. Confirmation

6.4.3.1. Tests biochimiques

- Identifier les différentes colonies par l'emploi de galeries miniaturisées spécifiques (galerie API 20E) en se reportant aux prescriptions du fabricant.
- Incuber 24H à 37 °C □ 1 °C.
- Ensemencer en parallèle : une gélose pour confirmer la pureté de la souche.
- 1 gélose TSAYE inclinée pour le sérotypage.
- Incuber 24H à 37 °C □ 1 °C.
- Lire la galerie API20E en suivant les indications du fabricant.
- Comparer le profil obtenu aux profils types donnés par le fabricant.
- Conserver la gélose TSAYE inclinée au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

6.4.3.2. Tests sérologiques :

Ils sont réalisés lorsque le profil de la souche correspond à une *Salmonella.* Les tests sont effectués selon les prescriptions définies par le fabricant à partir de culture pure obtenue sur la gélose et après élimination des souches auto-agglutinables.

Elimination des souches auto-agglutinables :

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Déposer une goutte de solution saline à 8,5 g/l sur une lame de verre parfaitement propre.
- Y disperser un peu de culture prélevée sur la gélose nutritive pour obtenir une suspension homogène et trouble à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Faire osciller la lame durant 30 à 60s.
- Observer sur fond noir à l'aide d'une loupe : si on observe des amas plus ou moins distincts la souche est considérée comme auto-agglutinable et ne peut être soumise au sérotypage.

6.5. Résultats

Selon les résultats de l'interprétation des tests biochimiques et sérologiques le résultat est exprimé comme suit :

- Présence de *Salmonella* dans m gramme(s) ou ml de produit.
- Absence de *Salmonella* dans m gramme(s) ou ml de produit.

Schéma du mode opératoire

Préparation		peser m gramme ou millilitre d'échantillon
de la		ajouter v fois m gramme ou millilitre d'EPT
↓suspension mère	*broyage*	1 minute en stomacher
↓Pré-enrichissement	*incubation*	16 à 20H à 37 °C □1 °C
↓enrichissement		1ml de pré-enrichissement

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

		récipient de culture prêt à l'emploi			
↓	*incubation*	24H ▫ 30 mn à 41 °C ▫1 °C			
lecture		partie supérieure du tube			
↘ ↙		**A**		**B**	
interprétation	*coloration*	autre	noire	rouge ou noire	autre
↓		▫	▫	▫	▫
↓↓↓					
interprétation		absence	**présence**	**présence**	absence
↓↓					
↓ confirmation			1 Öse dans 5 ml d'EPT		
↓					
		isolement en stries sur gélose sélective			
	incubation		16 à 24H à 37 °C ▫1°C		
↓↓					

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

	choix des colonies	au moins 2 colonies caractéristiques à partir de chaque boîte

↓

cf schéma des tests de confirmation

Schéma des tests de confirmation

↓choix des colonies — colonies caractéristiques

purification — isolement sur gélose sélective si nécessaire

↓ *incubation* — 16 à 24H à 37 °C ▫1 °C

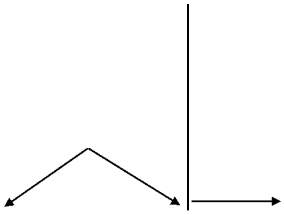
↘↙ identifi cation biochimique — colonie parfaitement isolée

↘↙ — isolement sur gélose sélective (vérification de la pureté) — ensemencement de la galerie miniaturisée

incubation — 16 à 24H à 37 °C ▫1 °C

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003



souche pure



non oui lecture de la galerie miniaturisée



purification profil *Salmonella*



identification sérologique oui autre

identification *repiquages* sur géloses TSAYE inclinées



- 1tube pour la sérologie

sérologique

sérologie absence d'auto-agglutination et agglutination des antigènes O :

Salmonella

Schéma des interprétations biochimiques et sérologiques.

Réactions biochimiques	Auto-agglutination	Réactions sérologiques	Interprétation
typiques	non	antigène « O » positive	*Salmonella*

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

typiques	non	réactions négatives	envoi à un centre agréé
typiques	oui	non effectuées	pour détermination du sérotype

7. Dénombrement des *Escherichia coli* par comptage des colonies obtenues à 44 °C

7.1. Principe

Un ensemencement en profondeur en gélose Rapid *E.coli* est réalisé en boite de Pétri pour chacune des dilutions retenues. Après une incubation de 24H à 44 °C, toutes les colonies caractéristiques apparues sont dénombrées.

7.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

Boites de Pétri stériles en matière plastique diamètre 90 millimètres.

Tubes à essais stériles en verre 16x160 cotonnés.

Portoir de tubes.

Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.

Bain d'eau à 100 °C ± 2 °C.

Bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.

Agitateur de tubes.

Etuve à 44 °C ± 1 °C.

Bec Bunsen.

Compteur de colonies.

7.3. Réactifs

Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS)

Tubes 16x160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile

Gélose Rapid'*E.coli* en surfusion (R.EC)

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

7.4. Mode opératoire

7.4.1. Le milieu gélosé

- Faire fondre la gélose R.EC au bain d'eau bouillant en évitant toute surchauffe.
- Ne jamais utiliser un milieu de culture à une température supérieure à 50 °C.
- Pour une utilisation immédiate maintenir la gélose au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Ne pas maintenir une surfusion de plus de 8H.
- Pour une utilisation différée maintenir la gélose en surfusion à l'étuve à 55 °C ±1 °C.
- Les milieux de culture fondus et non utilisés dans les 8H ne seront jamais resolidifiés pour une utilisation ultérieure.

7.4.2. Mise en culture

- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation dans les boîtes de Pétri et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Transférer 1 ml, de la suspension mère et ou des dilutions décimales retenues, dans les boites de Pétri respectives en changeant de pipette à chaque dilution.
- Introduire, au plus 20 minutes après l'inoculum, 15 à 20 ml de R.EC maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Homogénéiser doucement par agitation.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Couler environ 4 à 5 ml de R.EC maintenue à 47 °C ± 2 °C.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut).
- Retourner les boites et incuber aussitôt à l'étuve 24H ± 2H à 44 °C ± 1 °C.

7.4.3. Dénombrement

Les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

Si seule la boîte ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution renferme des colonies caractéristiques et en nombre inférieur à 15, elle sera retenue pour le dénombrement.

Les colonies caractéristiques sont dénombrées à l'aide d'un compteur ou manuellement après 24H □ 2H d'incubation.

7.5. Résultats

7.5.1. Cas général

Les boites contiennent entre 15 et 150 colonies caractéristiques, au niveau de deux dilutions successives.

7.5.1.1. Mode de calcul

Les 2 boites retenues présentent entre 15 et 150 colonies caractéristiques. Le nombre N de micro-organismes dénombrés à 44,5 °C par millilitre ou par gramme de produit est obtenu en calculant la moyenne pondérée sur les 2 boites retenues.

$$N = \frac{\sum c}{1{,}1d}$$

□c : somme des colonies caractéristiques dénombrées sur les 2 boites retenues

d : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution

7.5.1.2. Expression des résultats

- Arrondir le nombre N à 2 chiffres significatifs
- Exprimer en puissance de 10

ex. : 1,6 10^3 / g ou ml

7.5.2. Estimation des petits nombres

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies caractéristiques, exprimer le résultat comme suit :

$$N = c\frac{1}{d}$$

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

c : somme des colonies caractéristiques dénombrées

d : taux de dilution

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucune colonie exprimer le résultat comme suit :

$N = < 1\frac{1}{d}$ micro-organisme par g ou ml

d : taux de dilution

8. Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage et confirmation des colonies obtenues à 37 °C

8.1. Principe

A partir de l'échantillon (produit liquide) ou de la solution mère (autres produits), on réalise des dilutions décimales et, en parallèle, on ensemence en surface 1 gélose Baird Parker précoulée en boîte de Pétri avec chacune des dilutions retenues.

Après une incubation de 48H à 37 °C les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques apparues sont dénombrées puis confirmées par le test de la coagulase.

8.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

- Tubes à essais stériles en verre 16x160 cotonnés.
- Tubes à hémolyse stériles en matière plastique avec bouchon plastique.
- Portoir de tubes.
- Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
- Étaleurs stériles en matière plastique.
- Pipettes Pasteur stériles.
- Agitateur de tubes.
- Étuve 37 °C ± 1 °C.
- Bec Bunsen.
- Compteur de colonies.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

8.2.1. Réactifs

- Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS).
- -Tubes 16x160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile.
- Gélose Baird Parker précoulée en boîte de Pétri.
- Tubes pré-remplis avec 5ml de bouillon cerveau coeur (stériles).
- Plasma de lapin lyophilisé à réhydrater au moment de l'emploi.

8.2.2. Mode opératoire

8.2.2.1. Mise en culture

- Sécher les boîtes de gélose dans une étuve à 46 °C □ 1 °C jusqu'à disparition complète des gouttelettes à la surface du milieu. (couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas).
- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation à la surface des boites gélosées et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Déposer 0,1 ml, de la suspension mère et / ou des dilutions décimales retenues, à la surface de la gélose en changeant de pipette à chaque dilution.
- Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à l'aide d'un étaleur sans toucher les bords de la boîte.
- Laisser les boîtes, couvercle fermé, pendant 15 minutes à température ambiante.
- Incuber à l'étuve 48H ± 2H à 37 °C ± 1 °C

8.2.2.2. Dénombrement

Les boites contenant moins de 150 colonies caractéristiques et / ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues ; mais l'une d'entre elle doit renfermer au moins 15 colonies. Les colonies caractéristiques et / ou non caractéristiques sont dénombrées soit à l'aide d'un compteur soit manuellement.

Colonies caractéristiques après 48H ± 2H d'incubation :

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Noires ou grises, brillantes et convexes dont le diamètre est au minimum de 1 mm et au maximum 2,5 mm entourées d'un halo d'éclaircissement et de précipitation.

Colonies non caractéristiques après 48H ± 2H d'incubation :

- Noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit avec les halos d'éclaircissement et de précipitation absent ou à peine visibles.
- Grises dépourvues de zone claire.

8.2.2.3. Confirmation

Prélever 3 colonies caractéristiques ou 3 colonies de chaque type (caractéristique ou non caractéristique) et les soumettre au test de la coagulase.
test de la coagulase :

a. Culture en bouillon :

- Prélever une partie de la colonie sélectionnée à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée à la flamme du bec Bunsen et l'ensemencer dans un bouillon cerveau coeur.
- Répéter cette manipulation pour les autres colonies sélectionnées.
- Identifier les tubes par le n° de l'échantillon et sa dilution avec un marqueur bleu pour les colonies caractéristiques et un marqueur vert pour les colonies non caractéristiques.
- Incuber à 37 °C ± 1 °C pendant 20 à 24H 2H.

b. Recherche de la coagulase libre :

- Ajouter 0,5 ml de la culture obtenue en bouillon cerveau coeur à 0,5 ml de plasma de lapin réhydraté dans un tube à hémolyse stérile identifier comme ci-dessus.
- Répéter cette manipulation pour chaque culture en bouillon.
- Incuber 4 à 6H à 37 °C ± 1 °C.
- Vérifier la présence d'un coagulum sinon examiner le tube à 24H 2H d'incubation.

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

8.2.3. Résultats

La coagulase est considérée comme positive quand le coagulum occupe les ¾ du volume initialement occupé par le liquide.

8.2.3.1. Cas général

Les boites contiennent au maximum 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

mode de calcul :

- Nombre de Staphylocoques à coagulase positive pour chaque boîte : a

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times c^{nc}$$

A^c est le nombre de colonies caractéristiques repiquées;

A^{nc} est le nombre de colonies non caractéristiques repiquées;

b^c est le nombre de colonies caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive ;

b^{nc} est le nombre de colonies non caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive

c^c est le nombre total de colonies caractéristiques de Staphylocoques coagulase positive
pour la boîte retenue ;

c^{nc} est le nombre total de colonies non caractéristiques de Staphylocoques coagulase
positive pour la boîte retenue.

Arrondir la valeur obtenue au nombre entier le plus proche.

- Nombre de Staphylocoques à coagulase positive dans la prise d'essai : N

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

C'est la moyenne pondérée, calculée de la façon suivante à partir des deux dilutions successives retenues :

$N = \frac{\sum a}{1,1 \times F} \times 10$ Staphylocoques à coagulase positive par g ou ml

¤a : somme des colonies de Staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les 2 boîtes retenues

F : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution retenue.

Expression des résultats :

- Arrondir le nombre N à deux chiffres significatifs
- Exprimer en puissance de 10

ex.:	valeur obtenue	valeur arrondie	résultat
	36364	36000	$3,6\ 10^4$

8.2.3.2. Estimation des petits nombres :

Si la boîte ensemencée avec 0,1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies, le résultat sera exprimé comme suit :

$N = a\frac{1}{d} \times 10$ Staphylocoques coagulase positive par g ou ml

a : nombre de Staphylocoques à coagulase positive identifiés.

d : taux de dilution de la 1ère dilution retenue pour l'analyse.

Si la boîte ensemencée avec 0,1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucun Staphylocoque à coagulase positive exprimer le résultat comme suit :

$N < \frac{1}{d} \times 10$ Staphylocoques coagulase positive par g ou ml

d : taux de dilution de la 1ère dilution retenue pour l'analyse.

9. Dénombrement des coliformes par comptage des colonies obtenues à 30 °C

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

9.1. Principe

Un ensemencement en profondeur en gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est réalisé en boite de Pétri pour chacune des dilutions retenues. Après une incubation de 24H à 30 °C toutes les colonies caractéristiques apparues sont dénombrées.

9.2. Appareillage et conditions analytiques

Les mises en culture sont réalisées dans la zone de stérilité assurée par le bec Bunsen.

- Boites de Pétri stériles en matière plastique diamètre 90 millimètres.
- Tubes à essais stériles en verre 16 x 160 cotonnés.
- Portoir de tubes.
- Pipettes stériles en matière plastique de 2 ml graduées en 0,1 ml.
- Bain d'eau à 47 °C ± 2 °C.
- Agitateur de tubes.
- Etuve 30 °C ± 1 °C.
- Etuve 55 °C ± 1 °C.
- Bec Bunsen.
- Compteur de colonies

9.3. Réactifs

- Diluant stérile pour dilutions décimales : tryptone sel (TS)
- Tubes de 16 □ 160 stériles pré-remplis avec 9ml de TS stérile
- Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) en surfusion.

9.4. Mode opératoire

9.4.1. Le milieu gélosé

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

- Dès sa préparation maintenir la gélose VRBL en surfusion au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C (utilisation immédiate).
- Ne jamais utiliser un milieu de culture à une température supérieure à 50 °C.
- Ne pas maintenir une surfusion de plus de 8H.
- Pour une utilisation différée maintenir la gélose en surfusion dans l'étuve à 55 °C ±1 °C.
- Les milieux de culture fondus et non utilisés dans les 8H ne seront jamais resolidifiés pour une utilisation ultérieure.

9.4.2. Mise en culture

- Homogénéiser chaque dilution avant inoculation dans les boîtes de Pétri et avant la réalisation des dilutions décimales.
- Transférer 1 ml, de la suspension mère et/ou des dilutions décimales retenues, dans les boites de Pétri respectives en changeant de pipette à chaque dilution.
- Introduire, au plus 20 minutes après l'inoculum, 15 à 20 ml de VRBL maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C
- Homogénéiser doucement par agitation.
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut)
- Couler environ 5 ml de VRBL maintenue au bain d'eau à 47 °C ± 2 °C
- Laisser solidifier sur la paillasse (couvercle en haut)
- Retourner les boites et incuber aussitôt à l'étuve 24H □ 2H à 30 °C □ 1 °C

9.4.3. Dénombrement

Les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives sont retenues ; mais l'une d'entre elles doit renfermer au moins 15 colonies caractéristiques

Si seule la boîte ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution renferme des colonies caractéristiques et en nombre inférieur à 15, elle sera retenue pour le dénombrement.

Les colonies caractéristiques sont dénombrées à l'aide d'un compteur ou

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

manuellement.

- Colonies caractéristiques après 24H □ 2H d'incubation
- Colonies violacées entourées, parfois, d'une zone rougeâtre (précipitation de la bile)
- Diamètre □ 0,5 mm

9.5. Résultats

9.5.1. Cas général

Les boites contiennent moins de 150 colonies, caractéristiques ou non, au niveau de deux dilutions successives mais l'une d'entre elles renferme au moins de 15 colonies caractéristiques

mode de calcul :

Le nombre N de microorganismes dénombré à 30 °C par millilitre ou par gramme de produit est obtenu en calculant la moyenne pondérée sur les 2 boites retenues.

$$N = \frac{\sum c}{1{,}1d}$$

□c : somme des colonies caractéristiques dénombrées sur les 2 boites retenues

d : taux de dilution correspondant à la 1ère dilution

Expression des résultats :

- Arrondir le nombre N à 2 chiffres significatifs
- Exprimer en puissance de 10

ex. : 1,6 10^3 / g ou ml

9.5.2. Estimation des petits nombres

Si la boite ensemencée avec 1 ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse renferme moins de 15 colonies caractéristiques, le résultat sera exprimé comme suit :

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003

$$N = c\frac{1}{d}$$

c : somme des colonies caractéristiques dénombrées

d : taux de dilution

Si la boite ensemencée avec 1ml de la 1ère dilution retenue pour l'analyse ne contient aucune colonie exprimer le résultat comme suit :

$N =< 1\frac{1}{d}$ micro-organisme par g ou ml

d : taux de dilution.

---

[1] Point étudié ultérieurement par la sous commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins

[2] Point étudié ultérieurement par le groupe d'expert "Microbiologie du vin"

[3] Point étudié ultérieurement par le groupe d'expert "Microbiologie du vin"

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale

© OIV 2003