RÉSOLUTION OENO 8/95

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES VINS ET DES MOÛTS

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

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 LA PROPOSITION de la Sous-Commission conventionnelle d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DÉCIDE de compléter le Recueil international des méthodes d'analyse des vins et des moûts par: "**Analyse microbiologique des vins et des moûts : Détection, différenciation et dénombrement des micro-organismes**".

Objectif :

L'analyse microbiologique a pour but de suivre les fermentations alcoolique et/ou malolactique et de déceler les risques d'altérations microbiennes, ce qui permet de détecter toute anomalie, non seulement dans le produit fini, mais aussi pendant les différentes phases de sa fabrication.

Remarques :

Toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans les travaux de microbiologie, en utilisant du matériel stérilisé, à proximité de la flamme d'un bec Bunsen ou dans une chambre de flux laminaire et en flambant les orifices des pipettes, tubes, flacons, etc.

Avant de faire l'analyse microbiologique, il est nécessaire d'effectuer correctement le prélèvement de l'échantillon à analyser.

Champ d'application :

L'analyse microbiologique peut être appliquée au vin, au moût, aux mistelles et à tous ces produits même quand ils sont altérés par une activité microbienne.

Techniques d'analyse microbiologique :

Selon les informations qu'on prétend obtenir, on peut faire l'analyse microbiologique

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

en recourant aux techniques suivantes:

1. ESSAIS DE TENUE

1.1. Essai de tenue à l'air

1.2. Essai de tenue à l'étuve

2. DÉTECTION, DIFFERENCIATION DES MICRO-ORGANISMES ET DÉNOMBREMENT DIRECT DES LEVURES

2.1. Examen microscopique des liquides ou des dépôts

2.2. Coloration vitale avec le bleu de méthylène

2.3. Coloration de Gram

2.4. Recherche de la catalase

2.5. Dénombrement direct des levures au microscope

3. DÉNOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES PAR CULTURE

3.1. Culture en et sur milieu ou support solide

3.1.1. Culture en plaques

3.1.2. Culture sur membrane après filtration

3.2. Culture en milieu liquide - "Nombre le Plus Probable" (NPP)

Matériel :

Chambre de flux laminaire ;

Microscope ;

Étuve pour l'incubation entre 20 à 35 °C, munie d'un thermomètre ;

Étuve pour la stérilisation à sec, thermostatisée à 180 °C, munie d'un thermomètre ;

Étuve à CO_2 ou jarres hermétiques munies d'un générateur de CO_2, ou d'autres dispositifs qui donnent une atmosphère enrichie en CO_2 ;

pH-mètre étalonné en unités de pH permettant des mesures à ± 0,1 unités ;

Autoclave permettant la stérilisation convenable à la vapeur du matériel et des milieux de culture ;

Centrifugeuse ;

Bain-marie ;

Brûleur à gaz;

Balance avec sensibilité au dixième de mg ;

Hématimètre - compte-cellules de Neubauer ou équivalent ;

Dispositifs de filtration stérilisante avec membranes filtrantes stérilisées de 13 mm ou

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

25 mm de diamètre, de 0,22 µm de porosité, en esters de cellulose ou fluoride de polyvinylidène ou équivalent, avec des bords hydrophobes ;

Bec Bunsen ;

Fiole jaugée de 100 et 1000 ml;

Erlenmeyer de 100, 150, 300 et 1000 ml bouchés avec du coton cardé, stérilisés ;

Éprouvettes de 50, 100, 300, 500 et 1000 ml ;

Pipettes de 1, 10, 15, 20 et 25 ml, stérilisées ;

Tubes de centrifuge stérilisés ;

Tubes autoclavables en verre, sans rebord, dimensions 160 x 16 mm et 180 x 18 mm, bouchés avec du coton cardé, avant stérilisation, ou dispositif équivalent ;

Lames ;

Lamelles ;

Pipettes Pasteur stérilisées ;

Fil et anse stérilisés ;

Papier filtre ;

Huile d'immersion ;

Alcool à 70 et 95 % vol.

Remarque : d'autres équipements peuvent être utilisés à condition qu'ils accomplissent les mêmes fonctions.

Techniques de prélèvement d'échantillon :

Il est nécessaire que les échantillons soient représentatifs. On utilise des pipettes pour les fûts et de longs tubes de verre pour les cuves. On doit faire les prélèvements en endroits préalablement stérilisés pour éviter des contaminations extérieures qui donneraient des faux positifs. Ainsi, pour faire des prélèvements au "robinet dégustateur" des cuves, il est nécessaire de laisser couler quelques litres d'échantillon. Il faut désinfecter les surfaces de contact, par exemple, avec de l'alcool à 70% vol. ou avec un brûleur à gaz.

Les analyses des échantillons doivent être faites le plus rapidement possible après leurs prélèvements. Les échantillons doivent être placés au frais (4 à 5° C) pendant la durée du transport et du stockage, si l'on doit stabiliser la flore microbienne.

1. Essais de tenue

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Objectif :

Ces essais ont pour but de déceler à l'avance les risques d'altérations microbiennes.

Principe :

Cette technique est basée sur les modifications organoleptiques (troubles, voiles, dépôts, couleurs atteintes) présentées par le vin quand il est soumis à certaines conditions d'aération et de température qui peuvent traduire une activité microbienne. On devra confirmer par examen microscopique la nature de l'altération vérifiée.

Mode opératoire :

1.1. Essai de tenue à l'air

Un échantillon de 50 ml de vin après filtration sur papier filtre grossier stérile est placé dans un Erlenmeyer stérile de 150 ml bouché avec du coton et laissé à température ambiante au moins 3 jours. La limpidité, la couleur, la présence éventuelle d'un trouble, d'un dépôt, d'un voile sont examinés au cours du temps. Un examen microscopique est réalisé dans le cas d'un trouble, d'un dépôt, d'un voile, ou d'une couleur atteinte.

1.2. Essai de tenue à l'étuve

Un échantillon de vin de 100 ml après filtration sur papier filtre grossier stérile est placé dans un Erlenmeyer stérile, bouché avec du coton, mis dans une étuve à 30 ° C et examiné après au moins 72 h. Des altérations organoleptiques peuvent être l'indice d'un développement microbien. Un examen microscopique doit alors être effectué.

2. Détection, différenciation des micro-organismes et dénombrement direct des levures

2.1. Examen microscopique des liquides ou des dépôts

Objectif :

L'examen microscopique à l'état frais a pour but de déceler et de différencier les levures des bactéries éventuellement présentes. Toutefois, l'observation microscopique ne permet pas de distinguer les micro-organismes vivants de ceux qui

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

sont morts.

Remarque :

Avec une coloration vitale, on peut faire une estimation des levures vivantes.

Principe :

Cette technique est basée sur le grossissement effectué par le microscope qui permet l'observation des micro-organismes dont la taille est de l'ordre du micron.

Mode opératoire :

L'examen au microscope pourra se faire directement sur le liquide ou sur le dépôt.

L'observation directe sur le liquide n'est intéressante que quand la population est suffisamment élevée (plus de 5×10^5 cellules/ml).

Quand le vin présente une population de micro-organismes inférieure, il est nécessaire de faire une concentration. Ainsi, on centrifuge environ 10 ml de vin homogénéisé à 3000-5000 tours par minute pendant 5 à 15 minutes. Après décantation du liquide surnageant, on fait une homogénéisation du dépôt avec le liquide qui reste au fond du tube de centrifuge.

Pour réaliser l'observation au microscope, on dépose sur une lame de verre propre, avec une pipette Pasteur ou une anse stérilisées, une goutte de l'échantillon du liquide ou du dépôt homogénéisés. On recouvre avec une lamelle et on place la lame sur la platine du microscope. On observe en champ clair ou, de préférence à contraste de phase, ce qui permet de mieux observer les détails des micro-organismes. On utilise généralement un grossissement de 400-1000 diamètres.

2.2. Coloration vitale avec le bleu de méthylène

Objectif :

La coloration vitale avec le bleu de méthylène a pour but de différencier les levures vivantes des mortes.

Principe :

Cette coloration est basée sur la présence dans les cellules vivantes d'enzymes qui font la réduction du colorant. Par exemple, le bleu de méthylène est réduit en leucodérivé par les cellules vivantes qui restent incolores. Les cellules mortes absorbent le colorant et apparaissent colorées en bleu.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Réactif :

Solution de bleu de méthylène à 0,1 %

Préparation : dissoudre 0,1 g de bleu de méthylène avec 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer. Filtrer sur papier. La solution doit être fraîchement préparée.

Mode opératoire :

Déposer sur une lame une goutte d'échantillon et une goutte de colorant. Mélanger à l'aide d'un fil et au bout de 5 min. observer au microscope en champ clair.

Résultats :

Les cellules vivantes restent incolores et les cellules mortes se présentent colorées en bleu.

Remarques :

Ces méthodes de coloration ne sont pas sûres et ne s'utilisent que pour des énumérations approximatives, elles ne sont pas recommandées pour les bactéries.

Pour faire la différenciation entre les micro-organismes - levures et bactéries - vivants et morts, on peut aussi employer d'autres techniques plus élaborées comme, par exemple, celles qui font appel à la microscopie d'épifluorescense.

2.3. Coloration de Gram

Objectif :

La coloration de Gram a pour but de différencier les bactéries lactiques (Gram positives) des bactéries acétiques (Gram négatives) et aussi d'observer leur morphologie.

Remarques :

On doit tenir compte du fait que la coloration de Gram n'est pas conclusive car d'autres bactéries peuvent être présentes en dehors des bactéries lactiques et acétiques.

Principe :

Cette coloration est basée sur la différence présentée par les bactéries Gram positives et Gram négatives due à la diversité de structure et de composition chimique de leur parois cellulaires. Dans les bactéries Gram négatives, la paroi riche en lipides a une quantité très réduite de peptidoglucane, ce qui permet la pénétration de l'alcool qui

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

dissout le complexe violet de gentiane-iode qui se forme en laissant la cellule incolore, laquelle sera ensuite recolorée en rouge par la safranine. Au contraire, la paroi cellulaire des bactéries Gram positives a une grande quantité de peptidoglucane et une faible concentration de lipides. Ainsi, l'épaisse paroi de peptidoglucane et la deshydratation produite par l'alcool ne permettent pas la pénétration de l'alcool dans la cellule qui conserve la coloration violette ou bleue foncée du complexe violet de gentiane-iode.
Il y a plusieurs modifications à la technique de la coloration de Gram. La coloration de Gram perd sa signification si elle est réalisée sur une culture trop âgée. Ainsi, la souche doit être en phase de croissance exponentielle pendant 24 à 48 heures.

Solutions :

L'eau à utiliser doit être distillée.

1. Solution de violet de gentiane

Préparation : peser 2 g de violet de gentiane (ou cristal violet), introduire dans un Erlenmeyer de 100 ml et dissoudre dans 20 ml d'alcool à 95% vol. Dissoudre 0,8 g d'oxalate d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et utiliser seulement après 24 heures. Filtrer sur papier au moment de l'emploi. Maintenir à l'abri de la lumière en flacon foncé.

2. Solution de lugol

Préparation : dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans une quantité minime d'eau (4 à 5 ml) et, dans cette solution saturée, dissoudre 1 g d'iode. Compléter le volume de 300 ml avec de l'eau distillée. Maintenir à l'abri de la lumière en flacon foncé.

3. Solution de safranine

Préparation : peser 0,5 g de safranine dans un Erlenmeyer de 100 ml, dissoudre avec 10 ml d'alcool à 95% vol. et additionner 90 ml d'eau. Agiter. Maintenir à l'abri de la lumière en flacon foncé.

Mode opératoire :

Préparation du frottis

Faire un repiquage des bactéries en milieu liquide ou solide. Recueillir les bactéries

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

des cultures jeunes du dépôt (après centrifugation de la culture liquide) ou directement du milieu solide avec une anse ou un fil et mélanger dans une goutte d'eau stérilisée.

Faire un frottis sur une lame en étalant une goutte de la suspension microbienne. Laisser sécher le frottis. Ensuite, faire la fixation en passant rapidement la lame 3 fois à l'intérieur de la flamme d'un bec Bunsen ou par une technique équivalente.

Après refroidissement, faire la coloration.

Coloration :

Verser sur le frottis fixé quelques gouttes de solution de violet de gentiane. Laisser agir pendant 2 minutes et laver avec de l'eau.

Verser 1 à 2 gouttes de la solution de lugol. Laisser agir pendant 30 secondes. Laver avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Verser l'alcool à 95% vol., laisser agir pendant 15 secondes. Rincer avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Verser quelques gouttes de solution de safranine, laisser agir pendant 10 secondes. Laver avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Déposer sur le frottis coloré une goutte d'huile d'immersion.

Observer au microscope avec l'objectif à immersion en champ clair.

Résultats :

Les bactéries lactiques restent colorées de violet ou bleu foncé (Gram-positives). Les bactéries acétiques sont colorées en rouge (Gram-négatives).

2.4. Recherche de la catalase

Objectif :

Cette recherche a pour but de faire la distinction entre les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. Les levures et les bactéries acétiques ont une réaction positive. Les bactéries lactiques donnent une catalase négative.

Remarques :

On doit tenir compte du fait que la recherche de la catalase n'est pas conclusive car d'autres bactéries peuvent être présentes en dehors des bactéries lactiques et acétiques.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Principe :

La recherche de la catalase est basée sur la propriété qu'ont les micro-organismes aérobies de décomposer le peroxyde d'hydrogène avec libération d'oxygène:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

Réactif :

Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes.

Préparation : mesurer 10 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 volumes dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter le volume avec de l'eau distillée récemment bouillie. Agiter et maintenir dans le réfrigérateur dans un flacon foncé. La solution doit être fraîchement préparée.

Mode opératoire :

Déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes sur une lame et sur cette goutte un peu d'une colonie jeune. S'il y a libération gazeuse, on déduit que la culture contient de la catalase. Parfois, il est difficile d'observer directement le dégagement gazeux, nommément avec les colonies de bactéries, il est donc conseillé de faire l'observation au microscope (objectif x10).

2.5. Dénombrement direct des levures au microscope

Objectif :

Le dénombrement direct au microscope a pour but d'évaluer la population levurienne totale (vivante et morte).

Remarque :

Cette technique n'est indiquée que pour le comptage des levures. L'énumération des bactéries est difficile et approximative en raison de leur faible taille et, principalement, en raison de la présence de particules colloïdales. On peut utiliser cette technique pour estimer, grossièrement, les cellules vivantes en recourant à une coloration vitale avec du bleu de méthylène.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Principe :

La technique est basée sur le dénombrement de micro-organismes dans un volume connu d'échantillon à l'aide d'un microscope. Les dispositifs pour mesurer ce volume sont des lames spéciales du type hématimètre ou compte-cellules.

Remarque :

Les lames comportent une surface délimitée quadrillée qui, recouverte d'une lamelle épaisse optiquement plane, retient un volume connu d'échantillon.

Il y a divers compte-cellules. Par exemple, le compte-cellules de Neubauer, ici considéré, comporte une cavité centrale de 0,1 mm de profondeur et de 1 mm^2 de surface dont le fond est divisé en 400 petits carrés. Ainsi, le volume d'échantillon correspondant à un petit carré est de 1/400 mm^3.

Mode opératoire :

Déposer une goutte d'échantillon homogénéisé sur le plan central de la chambre en évitant des débordements. Recouvrir d'une lamelle épaisse en évitant des bulles gazeuses. Laisser reposer quelques minutes pour immobiliser.

La concentration ne doit être ni trop concentrée ni trop diluée. Lorsqu'il s'agit de populations très denses, l'échantillon doit être dilué. Par contre, lorsque le nombre de cellules à compter est faible, on doit faire une concentration par centrifugation.

Compter au microscope les micro-organismes, au hasard, de sorte que le total soit compris entre 200 et 500. Eviter de compter la même cellule 2 fois. Afin d'obtenir un chiffre représentatif, il faut faire le comptage dans des endroits différents. Ainsi, par exemple, on peut compter 5 grands carrés (comportant chacun 16 petits carrés), 1 au centre et 4 aux extrémités du plan quadrillé ou 5 grands carrés en diagonale.

Il convient de faire le comptage 2 fois. Effectuer la moyenne arithmétique des deux comptages, rapporter les résultats aux 400 petits carrés et multiplier par 10^4 pour exprimer en cellules par millilitre. Si éventuellement il y a besoin de faire des dilutions ou des concentrations, il est nécessaire de tenir compte du facteur de dilution ou de concentration.

3. Dénombrement des micro-organismes par culture

Objectif :

Le dénombrement des micro-organismes par culture a pour but d'évaluer le niveau de

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

contamination de l'échantillon, c'est-à-dire d'estimer sa stabilité microbienne puisque seuls les micro-organismes viables sont capables d'altérer le produit.

Selon les milieux de culture utilisés et les conditions de culture, on peut dénombrer trois types de micro-organismes : levures, bactéries lactiques et bactéries acétiques.

3.1. Culture en milieu solide

Principe :

Cette méthode est basée sur la présupposition qu'un micro-organisme viable, cultivé en ou sur milieu ou support solide nutritif spécifique et en conditions convenables, se multiplie en donnant lieu à une colonie visible à l'oeil nu.

3.1.1. Culture en plaques

Objectif :

Cette technique a pour but d'effectuer le dénombrement des micro-organismes quand la concentration microbienne est élevée, en effectuant des dilutions.

Matériel :

En dehors du matériel précédemment indiqué, on distingue:

boîtes de Pétri (plaques) de 57 cm^2 (plastique) ou 65 cm^2 (verre Pyrex).

Diluants et milieux solides de culture (*voir annexes 4 et 5*)

Mode opératoire :

L'énumération en boîtes de Pétri peut être réalisée par incorporation dans la masse ou sur la surface du milieu approprié après incubation convenable.

Préparation des dilutions :

Il faut réaliser des dilutions successives, décimales et croissantes de telle façon qu'on puisse obtenir le nombre le plus favorable (entre 30 et 300 colonies) pour le dénombrement et la différenciation des colonies, puisque l'on ne connaît pas à l'avance la concentration microbienne.

On peut faire une estimation des dilutions à effectuer au microscope; ainsi, en partant d'un échantillon homogénéisé, préparer une série de dilutions décimales (1:10) dans le diluant.

Prélever 1 ml d'échantillon et ajouter à 9 ml de diluant dans le premier tube. Homogénéiser. Prélever 1 ml de cette dilution pour ajouter à 9 ml de diluant dans le

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

deuxième tube. Continuer ce protocole de dilution jusqu'à la dernière dilution convenable, selon la population microbienne présumée, en utilisant des pipettes stériles pour chaque dilution *(voir le schéma de l' annexe 1)*.

Préparation des inoculations par incorporation en milieu gélosé :

Préparer des boîtes de Pétri de telle façon qu'on puisse obtenir une dilution qui donne des comptages entre 30 et 300 colonies.

Inoculer 1 ml d'échantillon et 1 ml de chacune des dilutions préparées et choisies selon la population microbienne présumée, les homogénéiser immédiatement, dans respectivement deux boîtes de Pétri, en utilisant des pipettes différentes et stérilisées ou des pipettes automatiques avec des cônes hydrophobes autoclavables. Ensuite, verser 15 ml de milieu de culture gélosé approprié, à la température de 42 à 45°C, préalablement liquéfié dans un bain bouillant (ou au four micro-ondes ou sur un agitateur magnétique chauffant) en évitant un chauffage prolongé. Homogénéiser immédiatement et doucement en effectuant plusieurs mouvements circulaires dans les deux sens en évitant la formation de bulles d'air et de débordements. Laisser refroidir jusqu'à solidification sur une surface plate.

Préparation des inoculations sur la surface du milieu gélosé :

Déposer 0,1 à 0,2 ml des dilutions choisies de l'échantillon de façon à ne pas avoir une quantité excessive de liquide à la surface de la gélose, ce qui donnerait lieu à un mauvais étalement. On devra utiliser des dilutions 10 fois plus concentrées que dans la méthode par incorporation. On fait une distribution homogène sur la surface du milieu nutritif, préalablement placé et solidifié en plaques à l'aide d'un étaleur en verre, arrosé d'alcool et passé à la flamme.

Incuber à l'étuve les plaques renversées:

- Levures - 20 à 25 °C, pendant 3 à 10 jours, en aérobiose.

(Remarque: pour le comptage des levures, l'incubation pendant 3 jours est normalement suffisante. Si l'on soupçonne la présence de *Dekkera Brettanomyces,* l'incubation doit être faite pendant 7 à 10 jours)

- Bactéries lactiques à 25 °C pendant 4 à 10 jours en anaérobiose ou microaérophilie.
- Bactéries acétiques de 25 à 30 °C pendant 2 à 4 jours en aérobiose.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Faire le comptage des colonies développées à l'oeil nu ou à l'aide d'une loupe ou dans un compteur de colonies. S'il y a des doutes, confirmer l'identité des colonies (levures ou bactéries) au microscope.

Tester la stérilité du milieu, du diluant et du matériel en faisant un essai en blanc avec un échantillon d'eau stérilisée pour chaque série d'essais.

Résultats :

Exprimer les résultats en Unités Formant de Colonies/ml - UFC/ml (au lieu de micro-organismes/ml, puisque chaque colonie peut résulter d'un micro-organisme ou d'un amas), en notation scientifique avec une décimale (par exemple 1100 sera rapporté comme "$1{,}1 \times 10^3$ UFC/ml").

Quand le nombre de colonies est calculé par estimation, les résultats sont exprimés en UFCE/ml (E - estimées).

Faire le comptage des plaques qui contiennent entre 30 et 300 colonies.

Calculer les UFC/ml en multipliant la moyenne arithmétique du nombre de colonies concernées par le facteur de dilution.

Indiquer la durée d'incubation.

Règles à suivre pour calculer les UFC par comptage et par estimation :

1. Faire la lecture sur les boîtes de chacune des dilutions qui contiennent entre 30 et 300 colonies et calculer la moyenne arithmétique.
2. S'il n'y a qu'une boîte sur les deux boîtes préparées qui contient entre 30 et 300 colonies, calculer la moyenne arithmétique des comptages des deux boîtes correspondant à cette dilution.
3. Si deux dilutions consécutives présentent des boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, faire la moyenne arithmétique pour le calcul, à condition que le nombre le plus grand ne dépasse pas le double du petit.

Si la relation des comptages, relativement à chacune des dilutions, est plus grande que 2, n'utiliser que le plus petit comptage (par exemple: 150 (dilution 10^{-1}) et 350 (dilution 10^{-2}); le rapport 350/150 est plus grand que 2. Ainsi, utiliser le plus petit nombre, c'est-à-dire 150, et calculer les UFC/ml en multipliant par le facteur de dilution).

4. Si toutes les boîtes ont moins de 30 colonies, considérer seulement les boîtes dont la

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

dilution est la plus basse (moins diluée). Déterminer la moyenne arithmétique et rapporter les résultats comme estimés.

5. Si les boîtes de toutes les dilutions ne contiennent pas de colonies et s'il n'y a pas de substances inhibitrices présentes, considérer les comptages comme "< 1,0" fois le facteur de la dilution la plus basse et rapporter les résultats comme estimés (par exemple : s'il n'y a pas de colonies dans la dilution 10^{-2} (plus basse), le résultat sera rapporté comme "< 1,0 x 10^2 UFCE /ml").
6. Si toutes les boîtes contiennent plus de 300 colonies, considérer le comptage le plus proche de 300 comme estimation. Ainsi, considérer seulement les boîtes de la dilution la plus élevée, c'est-à-dire la plus diluée et rapporter les résultats comme estimés.
7. Si le nombre de colonies par boîte dépasse de beaucoup 300, ne pas rapporter le résultat comme "TNTC" (*too numerous to count*). S'il y a moins de 10 colonies/cm^2, compter dans 13 carrés (du compteur de colonies) ayant une distribution représentative de colonies. Déterminer la moyenne arithmétique par carré et multiplier par le facteur approprié pour calculer les colonies estimées par boîte. De même, quand il y a plus de 10 colonies/cm^2, compter 4 carrés représentatifs, calculer la moyenne arithmétique par carré et faire le calcul comme indiqué auparavant. Le facteur est 57 pour les boîtes de 57 cm^2 de surface et 65 pour les boîtes de 65 cm^2de surface.
8. Quand il y a une surpopulation dans les boîtes, plus de 100 colonies/cm^2, rapporter les résultats comme estimés. Pour le calcul, multiplier 5700 ou 6500 par le facteur de la dilution la plus élevée. Par exemple, pour une dilution de 10^{-3}, les UFCE seront rapportées comme

   - "> 5,7 x 10^6 UFCE/ml" ou "> 6,5 x 10^6 UFCE/ml".

3.1.2. Méthode de filtration sur membrane

Objectif :

Cette technique a pour but d'effectuer le dénombrement des micro-organismes quand la population microbienne est faible. On effectue une concentration des micro-

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

organismes qui sont retenus sur une membrane filtrante d'une porosité convenable après filtration d'un volume donné d'échantillon.

Matériel :

En dehors du matériel précédemment indiqué, on distingue:

Pompe à vide ou dispositif équivalent ;

Ensemble de filtration (support-filtre et entonnoir) pour membranes de 47 mm de diamètre. Peut être en acier inox, en Pyrex, en plastique autoclavable ou stérile non autoclavable ;

Rampe de filtration ou fiole à vide ;

Piège pour insérer entre la fiole et la pompe à vide ;

Pinces pour fixation ;

Pinces à bords arrondis pour les membranes ;

Tenailles pour saisir l'ensemble de filtration lors de sa stérilisation (par flambage ou immersion en eau bouillante) ;

Marmite en acier inox pour stérilisation de l'ensemble de filtration en eau bouillante ;

Membranes filtrantes d'esters de cellulose de 47 mm de diamètre à bords hydrophobes préférablement blancs, quadrillées de 0,2 µm, 0,45 µm ou 0,8 µm de porosité. Utiliser de préférence des membranes en emballages individuels stériles fournis dans le commerce. Sinon, les stériliser à l'autoclave pendant 10 min. à 121 °C ;

Boîtes de Pétri en verre Pyrex ou plastique, stérilisées, de 60 mm ;

Tampons absorbants stérilisés.

Milieux de culture (*voir annexe 5*)

Mode opératoire :

1. Préparation des plaques

Préparer un nombre de boîtes de Pétri nécessaires avec le milieu de culture approprié. La membrane filtrante peut être placée sur milieu gélosé adéquat ou sur un support solide - tampon absorbant imbibé de milieu nutritif liquide convenable.

a. Boîtes de Pétri avec milieu gélosé adéquat *(voir annexe 5)*

Pour la préparation des boîtes, déposer environ 6 ml de milieu solide préalablement liquéfié au bain-marie ou similaire et laisser refroidir jusqu'à 45 °C, en boîtes de Pétri

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

de 60 mm. Laisser solidifier sur une surface plane. Retourner les boîtes, en les utilisant quelque temps après (minimum 2 à 3 heures).
On pourra utiliser des boîtes déjà préparées à condition qu'il n'y ait pas de contaminations et qu'elles ne soient pas sèches.

b. Boîtes de Pétri avec milieu liquide adéquat *(voir annexe 5)*

Si l'on veut utiliser le milieu nutritif liquide, la membrane est déposée sur un tampon absorbant imbibé de milieu liquide en boîtes de Pétri.
Pour la préparation des boîtes avec milieu liquide, ouvrir la boîte de Pétri et placer à l'intérieur un tampon absorbant stérile (il y a aussi des boîtes stériles avec tampons absorbants stériles).
On utilise généralement des ampoules fournies par le commerce de 2 ml de milieu nutritif liquide stérile ou équivalent.
Ouvrir une ampoule de 2 ml de milieu de culture liquide approprié et verser 1,8 ml environ sur le tampon absorbant, en répartissant sur toute la surface.

2. Filtration de l'échantillon

Utiliser des dispositifs de filtration autoclavés quand on commence une série de filtrations. Entre les filtrations, pour les unités en acier ou verre Pyrex, arroser d'alcool et passer à la flamme d'un bec Bunsen ou immerger dans de l'eau bouillante (marmite) pendant 5 minutes. Pour les dispositifs en plastique, on peut utiliser des moyens alternatifs de stérilisation comme, par exemple, une radiation U.V. avec une exposition pendant 2 minutes ou d'autres agents chimiques ou physiques appropriés.
Insérer un piège entre la fiole à vide et la pompe à vide. Adapter l'ensemble de filtration sur la fiole à vide. Fixer l'entonnoir sur le support filtre avec une pince de fixation appropriée.
Introduire quelques millilitres d'eau stérile pour provoquer une bonne adhérence de la membrane au support-filtre et laisser couler totalement.
Retirer la membrane filtrante, de porosité adaptée à la finalité désirée, de son emballage individuel stérile avec une pince flambée et refroidie auparavant.
Placer sur la base du support-filtre la membrane filtrante qui doit être centrée, quadrillage vers le haut .
Introduire un volume convenable homogénéisé d'échantillon selon la population présumée. Le chiffre considéré pour le comptage des colonies se trouve entre 20 et

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

200. Toutefois, l'idéal serait de ne pas dépasser 60 à 80 colonies afin de pouvoir bien les différencier.

Faire le vide. Après filtration, rompre le vide avec soin pour éviter le reflux. (Le volume de filtration varie, généralement, de 25 à 500 ml. Il faut toujours verser un volume connu d'échantillon. Si le volume de l'échantillon est plus bas que 20 ml, ajouter préalablement dans l'entonnoir un volume d'eau stérile de façon à couvrir la membrane et verser ensuite l'échantillon à filtrer à l'aide d'une pipette stérilisée.)

Retirer l'entonnoir et saisir la membrane avec la pince flambée refroidie et la déposer sur le milieu de culture dans la boîte de Pétri, quadrillage vers le haut.

Éviter la formation de bulles d'air entre la membrane et le milieu. Cela empêcherait un contact homogène et par conséquent un développement microbien correct.

Retourner la boîte et incuber à l'étuve pendant le temps et dans les conditions convenables selon les micro-organismes qu'on veut détecter.

Pour les levures :

Utiliser des membranes filtrantes de 0,45 µm ou 0,8 µm de porosité, milieu YEPD gélosé (*voir annexe 5*) et incuber en aérobiose, entre 20 et 25 °C, pendant 3 à 10 jours.

(Remarque: pour le comptage des levures, l'incubation pendant 3 jours est, normalement, suffisante. S'il l'on soupçonne la présence de *Dekkera Brettanomyces,* l'incubation doit être faite pendant 7 à 10 jours)

Pour les bactéries lactiques :

Utiliser des membranes filtrantes de 0,2 µm ou 0,45 µm de porosité, milieu de culture gélosé adéquat (*voir annexe 5*) et incuber en anaérobiose ou microaérophilie à 25 °C. La durée d'incubation peut atteindre 10 jours.

Pour les bactéries acétiques :

Utiliser des membranes filtrantes de 0,2 µm ou 0,45 µm de porosité, milieu de culture gélosé adéquat (*voir annexe 5)* et incuber en aérobiose, entre 25 et 30 °C, pendant 2 à 4 jours.

Faire le comptage des colonies développées à l'oeil nu ou à l'aide d'une loupe ou dans un compteur de colonies. Confirmer l'identité des colonies (levures ou bactéries) au microscope, si il y a des doutes.

Tester la stérilité des milieux, des membranes filtrantes et du matériel en faisant un essai en blanc avec un échantillon d'eau stérilisée pour chaque série d'essais.

Résultats :

Exprimer les résultats en Unités Formant de Colonies/ml - UFC/ml (au lieu de micro-organismes/ml, puisque chaque colonie peut résulter d'un micro-organisme ou d'un

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

amas).

Quand on filtre un grand volume de vin, et même ainsi les colonies développées sont en nombre trop réduit, on peut présenter les résultats relatifs au volume utilisé.

Si il n'y a pas développement de colonies et si il n'y a pas de substances inhibitrices présentes, rapporter les résultats comme

"< 1,0 UFC" par le plus haut volume de vin filtré.

Compter toutes les colonies de la membrane quand il y a 1 à 2 colonies par carré. Quand on obtient un nombre excessif de colonies par membrane, on doit si possible répéter l'analyse de l'échantillon avec une quantité plus basse d'échantillon.

Si le nombre de colonies est trop élevé (supérieur à 200), on peut faire des comptages estimatifs quand les colonies ne sont pas agglomérées et la distribution est représentative.

Si cela n'est pas possible, rapporter les résultats comme "TNTC" (*too numerous to count*).

Référer la porosité de la membrane utilisée et la durée d'incubation.

3.2. Culture en milieu liquide - "Nombre le Plus Probable" (NPP)

Objectif :

Cette technique a pour but de faire l'évaluation du nombre de micro-organismes viables dans les vins ayant des teneurs élevées en particules solides en suspension et/ou des indices élevés de colmatage.

Principe :

Cette technique est basée sur l'estimation du nombre de micro-organismes viables en milieu liquide, en partant du principe de sa distribution normale dans l'échantillon.

Diluants et milieux liquides de culture (*voir annexes 4 et 5*)

Mode opératoire:

On prépare plusieurs dilutions quantitatives et successives et, sur cette série, après incubation, une certaine proportion d'essais ne donnera lieu à aucune croissance (essais négatifs) une autre partie sera à l'origine d'un développement (essais positifs).

Si l'échantillon et les dilutions sont homogènes et si le nombre de dilutions est suffisamment élevé, il est possible de faire un traitement statistique des résultats en utilisant des tables convenables (tables basées dans les calculs de probabilité de McCrady) et de généraliser ce résultat à l'échantillon initial.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

Préparation des dilutions :

En partant d'un échantillon de vin homogénéisé, préparer une série de dilutions décimales (1:10) dans le diluant.

Prélever 1 ml de vin et ajouter à 9 ml de diluant dans le premier tube. Homogénéiser. Prélever 1 ml de cette dilution pour ajouter à 9 ml de diluant dans le deuxième tube. Continuer ce protocole de dilution jusqu'à la dernière dilution convenable, selon la population microbienne présumée, en utilisant des pipettes stériles pour chaque dilution. Les dilutions doivent être réalisées jusqu'à l'extinction, c'est-à-dire l'absence de développement dans les dernières dilutions *(voir le schéma de l'annexe 2)*.

Prépapation des inoculations :

Inoculer 1 ml de vin et 1 ml de chacune des dilutions préparées, homogénéisées sur le moment dans, respectivement, trois tubes avec du milieu de culture approprié (*voir annexe 5*). Homogénéiser.

Incuber les tubes inoculés dans l'étuve à 25 °C, pour les levures

(3 jours et jusqu'à 10 jours), en aérobiose et, pour les bactéries lactiques, en anaérobiose ou microaérophilie (8 jours et jusqu'à

10 jours), en faisant des observations périodiques jusqu'au dernier jour d'incubation.

Résultats :

On considère positifs tous les tubes qui présentent un développement microbien qui se traduit par la formation d'un sédiment blanchâtre, plus ou moins évident et/ou avec un trouble plus ou moins accentué. On doit confirmer les résultats avec l'observation au microscope. Référer la durée d'incubation.

La lecture des tubes se fait en annotant le nombre de tubes positifs ou négatifs de chaque combinaison de trois tubes (de chaque dilution). Par exemple, "3-1-0" signifie: trois tubes positifs dans la dilution 10^{0} (vin), un dans la dilution 10^{-1} et zéro dans la dilution 10^{-2}.

Pour un nombre de dilutions supérieur à trois, seulement trois de ces résultats sont significatifs. Pour sélectionner les résultats à adopter dans la détermination du "NPP", il est nécessaire de déterminer le "nombre caractéristique" selon les exemples du tableau suivant:

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

TABLEAU 1

NOMBRE DE TUBES POSITIFS POUR CHAQUE DILUTION						NOMBRE CARACTÉRISTIQUE
Exemple	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
a	3	3	3	1	0	3-1-0
a	3	3	2	0	0	3-2-0
a	3	2	1	0	0	3-2-1
a	3	0	1	0	0	3-0-1
b	3	2	2	1	0	3-2-3
b	3	2	1	1	0	3-2-2
c	2	2	2	2	0	2-2-2
d	0	1	0	0	0	0-1-0

Exemple a : prendre la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs et les deux suivantes.
Exemple b : si un résultat positif est noté pour une dilution plus grande que la dernière ainsi choisie, il faut l'ajouter à celle-ci.
Exemple c : si aucune dilution ne fournit trois tubes positifs, prendre les dilutions correspondantes aux trois derniers tubes positifs.
Exemple d : cas où le nombre de tubes positifs est très réduit, choisir le nombre caractéristique de façon à ce que la dilution positive occupe le rang des dizaines.

Adapté de Bourgeois, C.M. et Malcoste, R. *in* : Bourgeois, C.M. et Leveau, J.Y. (1991).

Calcul du Nombre le Plus Probable (NPP)

En tenant compte du nombre caractéristique obtenu, on détermine le NPP à travers la Table A *(annexe 3)* basée sur les calculs de probabilités de McCrady, en considérant la dilution effectuée. Si la concentration est de 10, 10^{-1}, 10^{-2}, la lecture est directe. Si la concentration est de 10^{1}, 10, 10^{-1}, la lecture est 0,1 fois cette valeur. Si la concentration est de 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, la lecture est dix fois cette valeur.

Remarque :

Si il est nécessaire d'augmenter le niveau de détection, on peut employer la concentration de 10^{1} de vin. Pour obtenir cette concentration de micro-organismes dans 1 ml, centrifuger 10 ml de vin et prélever 1 ml de sédiment (après avoir enlever 9 ml du liquide surnageant) que l'on inocule selon le mode décrit précédemment.

Expression des résultats :

La teneur en micro-organismes du vin doit être présentée en germes par millilitre, en

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT
OIV

© OIV 1995

notation scientifique avec une décimale. Si la teneur est inférieur à 1,0 germe par millilitre, on doit présenter le résultat comme "< 1,0 germe par/ml".

Bibliographie

1. ANDREWS, W. et MESSER, J. (1990). Microbiological Methods. *in:* AOAC Official Methods of Analysis, 15th edition, 1, 425-497, Association of Analytical Chemist, Washington.
2. BIDAN, P. (1992). Analyses Microbiologiques du Vin. *F.V. O.I.V.* nº 910, Paris.
3. BOURGEOIS, C.M. et LEVEAU, J.Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, 2ème édition, **3**. Le Contrôle Microbiologique,Lavoisier,Tec. & Doc.,APRIA Ed. Paris.
4. CARR, J. G. (1959). Aceti acid bacteria in ciders. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.*, 160.
5. DE MAN, J. C. (1975). The probability of most probable number. *European Journal of Applied Microbiology*, 1, 67-78.
6. LAFON-LAFOURCADE, S. et al. (1980). Quelques observations sur la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques. *Conn. Vigne Vin*, 14, 3, 183-194.
7. MAUGENET, J. (1962). Les *Acetobacter* du cidre. Identification de quelques souches. *An. Technol. Agric.*, 11, 1, 45-53.
8. PLARIDIS et LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Contrôle microbiologique des vins. *Bull. O.I.V.*, 618, 433-437, Paris.
9. RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E. (1961). Traité d' Oenologie, Tome 2, Librairie Polytechnique CH. Béranger, Paris et Liège.
10. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1976). 14th edition, American Public Health Association, Incorporated, New York.
11. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1985). 16th edition, American Public Health Association, DC 20005, Washington.
12. VAZ OLIVEIRA, M., BARROS, P. et LOUREIRO, V. (1995). Analyse microbiologique du vin. Technique des tubes multiples pour l'énumération de micro-organismes dans les vins - "Nombre le plus probable" (NPP), *F.V. O.I.V.* nº 987, Paris.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

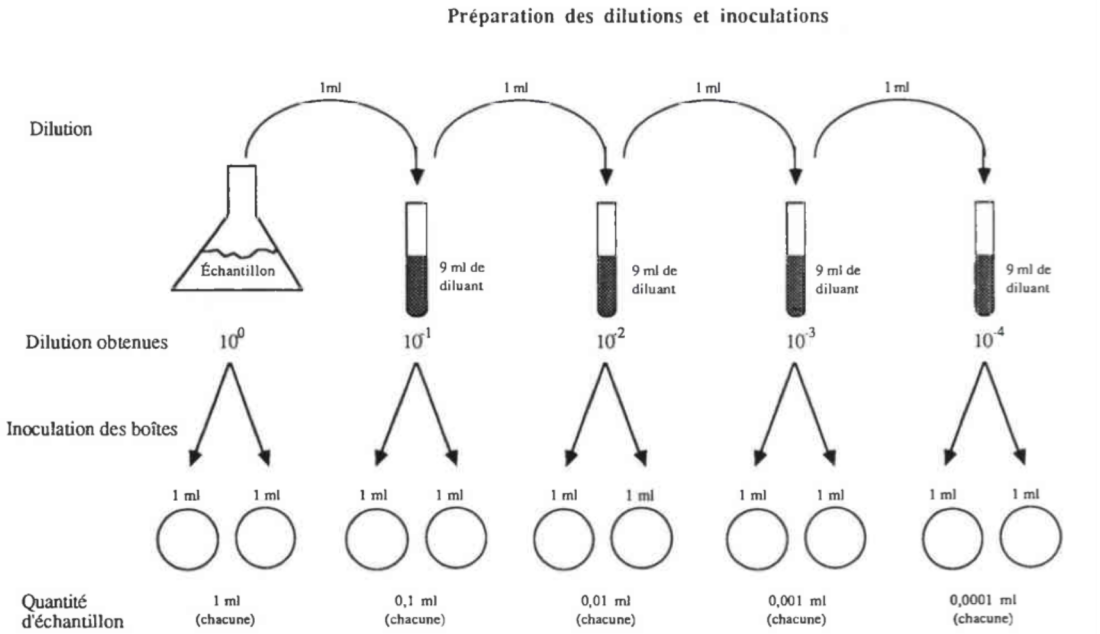
© OIV 1995

13. VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, Compte rendu des travaux du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 12ème session, annexe 2, Paris.

14. VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, 2ème partie, Doc. Travail du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 13ème session, Paris.

(Voir annexes pages suivantes)

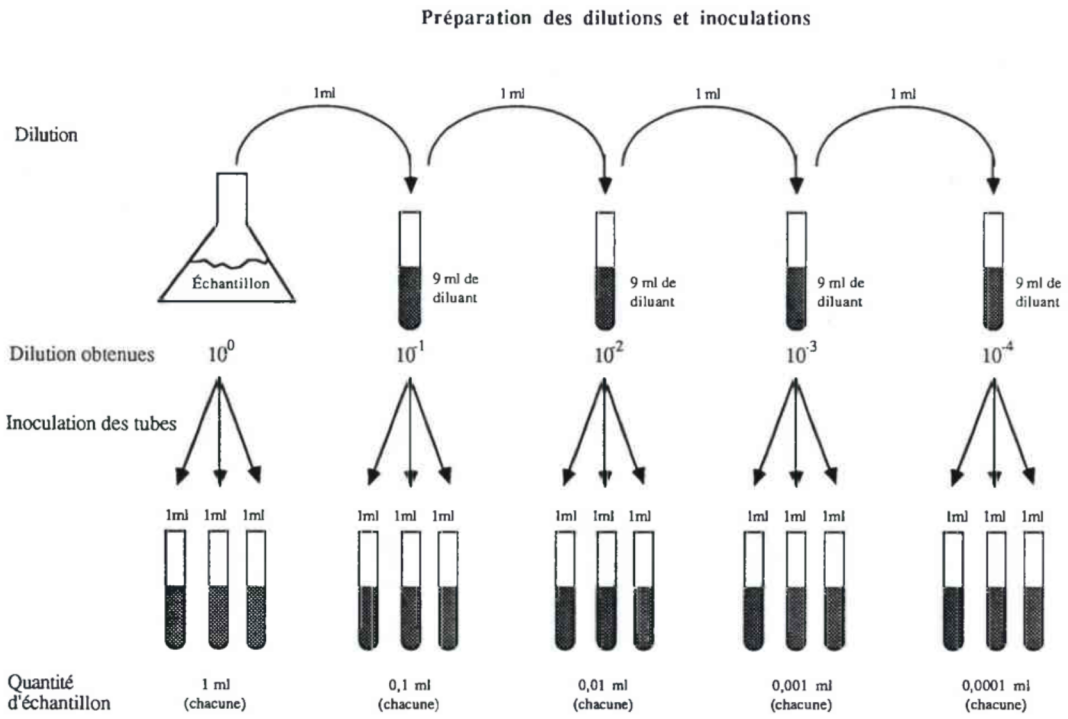
Annexe 1 - OENO 8/95



Annexe 2 - OENO 8/95

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995



Annexe 3 - OENO 8/95

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

TABLEAU A

« Nombre le plus probable » (NPP) par 1 ml d'échantillon en utilisant 3 tubes avec 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml

TUBES POSITIFS				TUBES POSITIFS				TUBES POSITIFS			
1 (ml)	0,1 (ml)	0,01 (ml)	NPP (ml)	1 (ml)	0,1 (ml)	0,01 (ml)	NPP (ml)	1 (ml)	0,1 (ml)	0,01 (ml)	NPP (ml)
0	0	0	0,0	2	0	2	2,0	1	1	1	7,5
0	0	1	0,3	2	1	0	1,5	3	1	2	11,5
0	1	0	0,3	2	1	1	2,0	3	1	3	16,0
0	1	1	0,6	2	1	2	3,0	3	2	0	9,5
0	2	0	0,6	2	2	0	2,0	3	2	1	15,0
1	0	0	0,4	2	2	1	3,0	3	2	2	20,0
1	0	1	0,7	2	2	2	3,5	3	2	3	30,0
1	0	2	1,1	2	2	3	4,0	3	3	0	25,0
1	1	0	0,7	2	3	0	3,0	3	3	1	45,0
1	1	1	1,1	2	3	1	3,5	3	3	2	110,0
1	2	0	1,1	2	3	2	4,0	3	3	3	> 140,0
1	2	1	1,5	3	0	0	2,5				
1	3	0	1,6	3	0	1	4,0				
2	0	0	0,9	3	0	2	6,5				
2	0	1	1,4	3	1	0	4,5				

Adaptée de « Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water » (1976).

Annexe 4 - OENO 8/95

© OIV 1995

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995

Le Directeur Général de l'OIV

Secrétaire de l'Assemblée Générale

Robert TINLOT

Diluants:

Les diluants sont indiqués à titre d'exemple.

L'eau à utiliser doit être distillée, bidistillée ou désionisée, sans traces de métaux, d'inhibiteurs ou d'autres substances antimicrobiennes.

1. Eau physiologique

Préparation: peser dans une fiole jaugée de 1000 ml, 8,5 g de chlorure de sodium. Après dissolution dans l'eau, ajuster le volume de référence. Homogénéiser. Filtrer. Distribuer 9 ml dans les tubes d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 20 min. à 121°C.

2. Solution de Ringer au 1/4

Préparation: peser, dans une fiole jaugée de 1000 ml, 2 250 g de chlorure de sodium, 0,105 g de chlorure de potassium, 0,120 g de chlorure de calcium (CaCl2.6H2O), 0,050 g de hydrogénocarbonate de sodium. Après dissolution dans de l'eau, ajuster le volume de référence. Homogénéiser. Distribuer 9 ml dans les tubes d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 15 min. à 121°C.

(On peut trouver cette solution déjà préparée dans le commerce).

Annexe 5 - OENO 8/95

Milieux de culture

Les milieux de culture et les antimicrobiens sont indiqués à titre d'exemple.

L'eau à utiliser doit être distillée, bidistillée ou désionisée, sans traces de métaux, d'inhibiteurs ou d'autres substances antimicrobiennes.

1. Milieux solides de culture

1.1. Pour les levures

Milieu YEPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose), gélosé + chloramphénicol

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 10 g d'extrait de levure (Difco ou

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

équivalent), 20 g de peptone, 20 g de glucose et 100 mg de chloramphénicol[(1)]. Dissoudre avec 450 ml d'eau.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 500 ml d'eau, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml avec de l'eau et mélanger. Distribuer des portions de 15 ml (pour l'énumération en plaques) et 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) dans les tubes d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 15 min. à 121°C.

Au lieu de chloramphénicol, on peut ajouter de la pénicilline 20 U/ml et de la streptomycine 40 U/ml sur la plaque au moment de la distribution du milieu.

1.2. Pour les bactéries lactiques

Milieu Lafon-Lafourcade et al, gélosé + actidione

Préparation : peser dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 5 g d'extrait de levure, 10 g d'extrait de viande, 15 g de peptone trypsique, 5 g d'acétate de sodium, 2 g de citrate d'ammonium, 0,05 g de sulfate de manganèse, 0,2 g de sulfate de magnésium, 20 g de glucose, 50 mg d'actidione[(2)] . Dissoudre avec 400 ml d'eau et corriger le pH à 5,4 avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 N ou une solution d'acide chlorydrique 1 N. Ajouter 1 ml de Tween 80.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 500 ml d'eau, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml avec de l'eau. Homogénéiser et distribuer 15 ml (pour l'énumération en plaques) ou 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) pour tube d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 20 min. à 121°C.

Milieu Dubois (Milieu 104), gélosé + actidione

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 5 g d'extrait de levure (Difco), 5 g de peptone, 3 g d'acide L-malique, 0,05 g de sulfate de magnésium, 0,05 g de sulfate de manganèse, 50 mg d' actidione. Dissoudre avec 200 ml d'eau. Ajouter 250 ml de jus de tomate et corriger le pH à 4,8 avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 N ou une solution d'acide chlorydrique 1 N. Ajouter une goutte de Tween 80.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 500 ml d'eau, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

avec de l'eau. Homogénéiser et répartir 15 ml (pour l'énumération en plaques) ou 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) par tube d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 20 min. à 121°C.

Milieu TJB (Tomato Juice Broth), gélosé + actidione

Préparation : peser dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 5 g de glucose,

2 g de tryptone (Difco), 5 g de peptone (Difco), 5 g d'extrait de levure (Difco), 1 g d'extrait de foie et 50 mg d'actidione. Dissoudre avec 400 ml de jus de tomate. Corriger le pH à 5,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 N ou une solution d'acide chlorydrique 1 N. Ajouter une goutte de Tween 80.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 500 ml de jus de tomate, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml avec du jus de tomate. Homogénéiser et répartir 15 ml (pour l'énumération en plaques) ou 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) pour tube d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 20 min. à 121°C.

Remarque :

Le jus de tomate utilisé est dilué 4,2 fois et filtré sur Whatman n°1 (1000 ml).

1.3. Pour les bactéries acétiques

Milieu G2, gélosé + actidione

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 1,2 g d'extrait de levure, 2 g de phosphate d'ammonium, 50 mg d'actidione. Ajouter 500 ml de cidre et corriger le pH à 5 avec une solution d'hydroxyde de sodium 1 N ou une solution d'acide chlorydrique 1N.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 450 ml d'eau dans un Erlenmeyer de 1000 ml, dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml avec de l'eau. Homogénéiser et répartir 15 ml (pour l'énumération en plaques) ou 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) pour tube d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 20 min. à 121°C.

Milieu de Carr, gélosé + actidione

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 30 g d'extrait de levure, 50 mg d'actidione. Dissoudre avec 500 ml d'eau. Ajouter 1 ml de vert de bromocrésol à 2,2 %.

A part, dissoudre 20 g de gélose avec 450 ml d'eau, dans un Erlenmeyer de 1000 ml,

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

dans un bain bouillant, en agitant fréquemment et en évitant un chauffage prolongé. Après dissolution totale, ajouter à l'autre solution et compléter le volume de 1000 ml avec de l'eau. Homogénéiser et répartir 15 ml (pour l'énumération en plaques) ou 6 ml (pour l'énumération par filtration sur membrane) pour tube d'essai. Boucher avec du coton cardé et autoclaver pendant 15 min. à 121°C. Au moment de l'emploi après liquéfaction et refroidissement à 45°C, ajouter au milieu gélosé 20 ml d'alcool/litre stérilisé par filtration (membrane de fluoride de polyvinylidène) et mélanger.

2. Milieux liquides de culture

2.1. Pour les levures

Milieu YEPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) + chloramphénicol

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 10,0 g d'extrait de levure (Difco ou équivalent), 20 g de peptone, 20 g de glucose et 100 mg de chloramphénicol. Dissoudre, compléter le volume de

1000 ml avec de l'eau et mélanger.

Distribuer des portions de 5 ml de ce milieu dans les tubes et autoclaver pendant 15 min. à 121 °C.

2.2. Pour les bactéries lactiques

Milieu MTJ (50% de Milieu MRS "Lactobacilli Man Rogosa and Sharpe Broth" + 50% Milieu TJB "Tomato Juice Broth") + actidione

Préparation : peser, dans un Erlenmeyer de 1000 ml, 27,5 g de MRS "*Lactobacilli* Man Rogosa and Sharpe Broth" (Difco ou équivalent). Additionner 500 ml d'eau, chauffer jusqu'à ébullition pour permettre la dissolution totale et ajouter 20,5 g de TJB "Tomato Juice Broth" (Difco ou équivalent). Additionner 50 mg d'actidione. Dissoudre avec de l'eau de façon à obtenir 1000 ml de solution après avoir corrigé le pH à 5,5 avec une solution d'acide chlorhydrique 1N et mélanger.

Distribuer des portions de 10 ml de ce milieu[(3)] dans les tubes et autoclaves pendant 15 min. à 121°C.

[(1)] pour éviter la croissance de la plupart des bactéries.

[(2)] pour éviter le développement de la plupart des levures.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995

[(3)] On utilise le volume de 10 ml au lieu de 5 ml comme dans le cas des levures, à cause de la plus grande sensibilité des bactéries lactiques à l'oxygène.

Exemplaire certifié conforme Punta del Este, 1 décembre 1995
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Robert TINLOT

© OIV 1995