

METHOD OIV-MA-AS4-01

Méthode Type IV

**Analyse microbiologique des vins et des moûts :
detection, différenciation et dénombrement des micro-
organismes**
(OIV-Oeno 206-2010)

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.

Remarque :

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 à flux laminaire et en passant à la flamme les orifices des pipettes, tubes, flacons, etc. Avant d'effectuer 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 aux vins, moûts, mistelles et à tous produits similaires, même lorsque ceux-ci sont altérés par une activité microbienne. Ces méthodes sont aussi adaptées à l'analyse des préparations industrielles de microorganismes sélectionnés, levures LSA et bactéries lactiques.

Techniques d'analyse microbiologique :

1. Réactifs et produits
2. Installations et équipement
3. Échantillonnage
4. Essais de tenue
 - 4.1 objectif
 - 4.2 principe
 - 4.3 mode opératoire
 - 4.3.1 essai de tenue à l'air
 - 4.3.2 essai de tenue à l'étuve

5. Techniques de microscopie pour la détection, différenciation des micro-organismes et dénombrement direct des levures

- 5.1. Examen microscopique des liquides ou des dépôts
- 5.2. Coloration de Gram pour la différenciation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)
- 5.3. Recherche de la catalase pour la différenciation des bactéries isolées à partir de colonies(voir paragraphe 6)
- 5.4. Dénombrement des cellules de levure – hémocytométrie
- 5.5. Dénombrement des cellules de levure – Coloration au bleu de méthylène

6. Dénombrement des micro-organismes par culture

- 6.1 Détection, différenciation et dénombrement des micro-organismes (numération sur plaque)
- 6.2. Culture en milieu liquide - "nombre le plus probable" (NPP).

1. RÉACTIFS ET PRODUITS

Équipement et appareillage courants de laboratoire, comme indiqué dans ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques.

Le matériel suivant est recommandé :

- Matériel et verrerie de laboratoire courants, stériles (stérilisés ou stériles prêts à l'emploi).
- Tubes (16x160 mm ou similaires) contenant 9 ml d'eau peptonée stérile (tryptone : 1 g/l) ou d'autres diluants à utiliser pour les dilutions d'échantillons en série.
- Éthanol pour passer à la flamme les étaleurs et les brucelles.
- Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %.
- Micropipette à bouts stériles : 1 ml et 0,2 ml.
- Tiges de verre coudées en L ou de forme triangulaire (crosses de hockey) ou étaleurs en plastique.

- Brucelles en acier inoxydable, à bords plats.
- Membrane de porosité 0,2 et 0,45 µm en ester de cellulose stérile (ou équivalent), d'un diamètre de 47 ou 50 mm, si possible avec une grille imprimée sur la surface, en conditionnement individuel.
- Éprouvettes stériles.
- Pipettes stériles de 10 ml.

2. INSTALLATIONS ET ÉQUIPEMENT

Équipement et appareillage courants de laboratoire, comme indiqué dans ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques.

Le matériel suivant est recommandé :

- Hotte microbiologique ou hotte à flux laminaire. En l'absence de ce dispositif, travailler à proximité (moins de 50 centimètres) d'un brûleur à gaz.
- Balance, d'une précision de $\pm 0,01$ g.
- Autoclave.
- Incubateur, réglable de 25°C à 37°C.
- pH-mètre, présentant une précision de $\pm 0,1$ unité pH et un seuil de mesure minimum de $\pm 0,01$ unité pH.
- Réfrigérateur(s), réglé(s) à 5 ± 3 °C, et congélateur(s) dont la température devra être inférieure à -18°C et de préférence égale à -24 ± 2 °C.
- Bain thermostatique, réglé à 45 ± 1 °C
- Four à micro-ondes.
- Microscope optique.
- Brûleur à gaz.
- Dispositif de comptage de colonies.
- Équipement de culture en atmosphère modifiée (fiole scellée dans laquelle l'anaérobiose peut avoir lieu).
- Appareillage de filtrage avec des filtres de diamètre 47 mm ou 50 mm (en cas de filtration sur membrane).
- Agitateur vortex ou équivalent ;
- Etuve pour la sterilisation à sec ;
- Centrifugeuse ;
- Pompe à vécue.

3. ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillon doit reproduire la microbiologie de la masse totale de moût ou de vin à analyser. Dans la mesure du possible, la masse doit être homogénéisée avant échantillonnage, afin de remettre en suspension les micro-organismes qui tendent à se déposer au fond du récipient. Lorsqu'une homogénéisation n'est pas souhaitée, les échantillons doivent être prélevés là où les micro-organismes sont susceptibles (ou suspectés) d'être présents (c.-à-d. en cas de recherche de levures au fond des réservoirs ou fûts), mais dans ce cas les résultats ne sont pas quantitatifs. Avant de prélever un échantillon provenant d'un robinet, ce dernier doit être passé à la flamme, et 2 à 3 litres de liquide doivent être évacués. L'échantillon doit être placé dans un récipient stérile.

L'échantillon doit être maintenu au frais et analysé le plus rapidement possible.

Les quantités suivantes d'échantillons sont nécessaires pour l'examen microbiologique :

Moût, ou moût en fermentation ou vin stocké : pas moins de 250 ml ;

Vin mis en bouteille ou emballé : pas moins d'une unité,
quelle que soit la capacité ;

4. ESSAIS DE TENUE

4.1 Objectif

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

4.2 Principe

Cette technique est basée sur les modifications organoleptiques et d'aspect (troubles, voiles, dépôts, couleurs inhabituelles) présentées par le vin quand il est soumis à certaines conditions d'aération et de température pouvant induire une activité microbiologique. La nature de l'altération devra être confirmée par examen microscopique.

4.3 Mode opératoire

4.3.1 Essais 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 pendant au moins 3 jours. La limpidité, la couleur, la présence éventuelle d'un trouble, d'un dépôt, d'un voile sont examinées au cours de cette période. Un examen microscopique est réalisé en cas de trouble, dépôt, voile ou changement de couleur.

4.3.2 Essais 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 de 300 ml, bouché avec du coton, mis dans une étuve à 30 ° C et examiné après au moins 72 h. Des altérations organoleptiques ou visuelles peuvent être l'indice d'un développement microbien. Un examen microscopique doit alors être effectué.

5. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES POUR LA DETECTION, LA DIFFERENTIATION DES MICRO-ORGANISMES ET LE DENOMBREMENT DIRECT DES LEVURES

5.1 Examen microscopique des liquides ou des dépôts

Objectif :

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

Remarque :

Une estimation des levures vivantes peut être effectuée à l'aide d'une coloration appropriée (voir plus loin).

Principe :

Cette technique repose sur le grossissement au microscope permettant d'observer des micro-organismes dont la taille est de l'ordre du micron.

Mode opératoire :

L'examen au microscope peut être effectué 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 inférieure de micro-organismes, il est nécessaire de concentrer l'échantillon. Environ 10 ml de vin homogénéisé sont donc centrifugés à 3000-5000 tr/mn pendant 5 à 15 minutes. Après décantation du liquide surnageant, le dépôt est remis en suspension dans le liquide restant au fond du tube de centrifugation.

Pour réaliser l'observation au microscope, une goutte de l'échantillon de liquide ou du dépôt homogénéisé est déposée sur une lame de verre propre à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse stérilisée. Recouvrir avec une lamelle et placer la lame sur la platine du microscope. L'observation s'effectue en champ clair ou, de préférence à contraste de phase, ce qui permet de mieux observer les détails des micro-organismes. Un grossissement optique de 400 x à 1000 x est généralement utilisé.

5.2. Coloration de Gram pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)

Objectif :

La coloration de Gram a pour but de différencier les bactéries lactiques (Gram positif) des bactéries acétiques (Gram négatif) et d'observer également leur morphologie.

Remarque :

Il convient de garder à l'esprit que la coloration de Gram ne suffit pas à conclure car d'autres bactéries peuvent être présentes en plus des bactéries lactiques et acétiques.

Principe :

Cette coloration est basée sur la différence de structure et de composition chimique des parois cellulaires. Des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Dans les bactéries à Gram négatif, la paroi riche en lipides a une quantité très réduite de peptidoglycane. Ceci permet la pénétration de l'alcool et l'élimination du complexe violet de gentiane-iode en laissant la cellule incolore, laquelle sera ensuite recolorée en rouge par la safranine. Au contraire, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif contient une grande quantité de peptidoglycane et une faible concentration de lipides. Ainsi, l'épaisse paroi de peptidoglycane et la déshydratation produite par l'alcool ne permettent pas l'élimination de la coloration violette ou bleue foncée du complexe violet de gentiane-iode.

La coloration de Gram perd sa signification si elle est réalisée sur une culture trop âgée. Ainsi, la bactérie doit être dans une phase de croissance exponentielle de 24 à 48 heures. La coloration de Gram est réalisée après isolement de colonies et mise en culture liquide.

Solutions :

L'eau utilisée 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 dans un flacon foncé.

2. Solution de Lugol

Préparation : dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans une quantité minimale d'eau (4 à 5 ml) et, dans cette solution saturée, dissoudre 1 g d'iode. Compléter le volume à 300 ml avec de l'eau distillée. Maintenir à l'abri de la lumière dans un 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 ajouter 90 ml d'eau. Agiter. Maintenir à l'abri de la lumière dans un flacon foncé.

Mode opératoire :

Préparation du frottis

Faire un repiquage des bactéries en milieu liquide ou solide. Recueillir les bactéries des cultures jeunes dans le dépôt (après centrifugation de la culture liquide) ou directement dans le 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. Procéder ensuite à la fixation en passant rapidement la lame 3 fois sur la flamme d'un bec Bunsen ou par une technique équivalente.

Après refroidissement, effectuer 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 en violet ou bleu foncé (Gram-positif). Les bactéries acétiques sont colorées en rouge (Gram-négatif).

5.3 Recherche de la catalase pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)

Objectif :

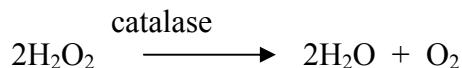
Cette recherche a pour but de faire la distinction entre les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. Les levures et les bactéries acétiques ont une réaction positive. Les bactéries lactiques donnent une réponse négative.

Remarque :

Il convient de garder à l'esprit que la recherche de la catalase ne suffit pas car d'autres bactéries peuvent être présentes en plus des bactéries lactiques et acétiques.

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 :



Réactif :

Solution de peroxyde d'hydrogène à 12 volumes (3%)

Préparation : mesurer 10 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 volumes dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau distillée récemment bouillie. Agiter et conserver au 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 ajouter un petit échantillon d'une colonie jeune. S'il y a libération de gaz, on peut en déduire que la culture possède l'activité catalase. Il est parfois

difficile d'observer directement le dégagement gazeux, notamment avec les colonies de bactéries ; il est donc conseillé de faire l'observation au microscope (objectif 10 x).

5.4. Dénombrement des cellules de levure – hémocytométrie

5.4.1 Champ d'application

Détermination de la concentration en cellules de levure dans les moûts ou vins en fermentation, et les LSA (levure sèche active). Une concentration cellulaire élevée est nécessaire : au moins 5×10^6 cellules/ml. Les moûts et vins en fermentation peuvent faire l'objet d'une numération directe, la levure sèche active (LSA) doit être diluée 1000 ou 10000 fois. Les moûts ou vins contenant peu de cellules doivent être centrifugés (3000 g, 5 minutes) et le sédiment remis en suspension dans un volume connu.,

5.4.2 Principe

Une goutte de suspension de cellules de levure est déposée à la surface d'une lame comportant une cellule de comptage. La cellule de comptage a un volume défini et est subdivisée en carrés à la surface de la lame. La numération est réalisée sous microscope en champ clair. Le contraste de phase n'est pas indiqué si des cellules sont colorées.

5.4.3 Réactifs et produits

- Hémocytomètre, double cellule, de préférence à pinces : Bürker, Thoma, Malassez, Neubauer.
- Lamelle couvre-objets pour hémocytomètre : les lamelles couvre-objets ordinaires (largeur 0,17 mm) ne conviennent pas pour cette utilisation, car elles sont souples et ne garantissent pas une largeur de cellule constante.
- Pipettes à bouts fins, d'un volume de 1 et 10 ml.
- Fiole jaugée, 100 ml.
- Bécher, 250 ml.

5.4.4 Installations et équipement

- Microscope avec éclairage à fond clair : grossissement 250-500 x.
Contraste de phase contre-indiqué.
- Barre magnétique et agitateur.

Des hémocytomètres sont disponibles avec différentes cellules de comptage : Thoma, Malassez, Bürker, Neubauer. Confirmer le type et le volume de la cellule de comptage à utiliser. Les cellules de Bürker, Thoma et Neubauer ont une profondeur de 0,1 mm , la cellule de Malassez 0,2 mm.

La cellule de Thoma possède un grand carré central (1 mm^2), ce qui fait que son volume est de $0,1 \text{ mm}^3$ (10^{-4} ml). Ce grand carré est subdivisé en 16 carrés, eux mêmes subdivisés en 16 petits carrés. Les petits carrés ont 0,05 mm de côté et une profondeur de 0,1 mm, de sorte que le volume de chaque petit carré est de $0,00025 \text{ mm}^3$ ($25 \times 10^{-8} \text{ ml}$). Il est également possible de compter dans les carrés moyens. Chaque carré moyen a 16 petits carreaux de 0,2 mm de côté, et d'un volume de $0,004 \text{ mm}^3$ soit $4 \times 10^{-6} \text{ ml}$.

La cellule de Bürker contient 9 grands carrés de 1 mm^2 de côté, divisés en 16 carrés moyens de 0,2 mm de côté par des doubles lignes espacées de 0,05mm. La surface de chacun de ces carrés moyens est de $0,04 \text{ mm}^2$ et le volume de $0,004 \text{ mm}^3$. Les petits carrés formés par les double lignes ont une surface de $0,025 \text{ mm}^2$.

Les grands, moyens et petits carrés des cellules de Neubauer, de Thoma et de Bürker sont de même taille. Les carrés moyens des cellules de Bürker ne contiennent pas d'autres lignes à l'intérieur ; ce sont donc probablement les plus faciles à compter.

5.4.5 Méthodes d'examen

La cellule de comptage et la lamelle couvre-objets doivent être propres et sèches avant utilisation. Il peut être nécessaire de frotter la surface quadrillée, car des cellules sales ont une incidence sur le volume de l'échantillon. Nettoyer à l'eau déminéralisée, ou à l'éthanol, et sécher avec un papier doux.

En cas de numération de levure floculante, le milieu de suspension doit être de l'acide sulfurique à 0,5 %, afin d'éviter la flocculation, mais ceci interdit la possibilité de coloration au bleu de méthylène et le comptage des cellules viables et des cellules mortes. La remise en suspension peut être effectuée par sonication.

Déposer l'échantillon sur la lame à l'aide d'une pipette à bout fin, en suivant l'un des deux modes opératoires énoncés ci-dessous.

Mode opératoire 1

Bien mélanger la suspension de levure. Si des dilutions sont nécessaires, procéder par dilutions décimales, comme d'habitude. En cas de coloration au

bleu de méthylène, effectuer la coloration sur l'échantillon le plus dilué en mélangeant 1 ml d'échantillon avec 1 ml de solution de bleu de méthylène. Agiter en permanence la suspension de levure. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et déposer une petite goutte de suspension de levure (diluée au besoin) sur chacune des deux zones quadrillées de la lame. Recouvrir avec la lamelle couvre-objets dans les 20 secondes qui suivent et presser fermement avec les pinces. La zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole.

Mode opératoire 2

Disposer la lamelle couvre-objets rigide de sorte que les deux cellules de comptage soient également couvertes. Utiliser les pinces pour presser la lamelle couvre-objets sur le support jusqu'à ce qu'une irisation apparaisse (anneaux de Newton). En l'absence de pinces, ne pas déplacer la lamelle couvre-objets en remplies la cellule.

Agiter en permanence la suspension de levure. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et laisser une petite goutte d'échantillon couler entre l'hémocytomètre et la lamelle couvre-objets. Procéder de même dans l'autre partie de la lamelle. La zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole.

Laisser la lame préparée reposer pendant trois minutes, de façon à ce que les cellules de levure se déposent, et la placer sous le microscope.

Compter 10 carrés moyens dans chaque zone quadrillée. Des procédures normalisées doivent être définies, afin d'éviter de compter deux fois le même carré. Les cellules en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation supérieure ou droite ne sont pas prises en compte, celles en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation inférieure ou gauche sont comptées. Les cellules de levure en bourgeonnement sont comptées comme une seule cellule si la taille du bourgeon est inférieure à la moitié de celle de la cellule mère, dans le cas contraire les deux cellules sont comptées.

Pour obtenir une numération précise des cellules, il est recommandé de compter en moyenne au minimum un total de 200 à 500 cellules de levure. L'écart de numération entre les deux côtés de la lame doit être inférieur à

10 %. Si une dilution est utilisée, le facteur de dilution doit être intégré dans le calcul.

5.4.6 Expression des résultats

C étant le nombre moyen de cellules comptées dans un carré moyen de 0,2mm de côté, la population T totale dans l'échantillon est :

Exprimée en cellules/ml $T = C \times 0,25 \times 10^6 \times \text{facteur de dilution}$

C étant le nombre moyen de cellules comptées dans un petit carré de 0,05mm de côté, la population T totale dans l'échantillon est :

Exprimée en cellules/ml $T = C \times 4 \times 10^6 \times \text{facteur de dilution}$

5.4.7 Références

European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC.
Fachverlag Hans Carl, 2001

5.5 Dénombrement des cellules de levure – Coloration de cellules de levure au bleu de méthylène

5.5.1 Champ d'application

Cette méthode permet une estimation rapide du pourcentage de cellules viables (non colorées), car les cellules mortes sont colorées en bleu. La méthode est applicable à tous les échantillons contenant des levures, excepté aux moûts contenant plus de 100 g de sucre par litre.

Les bactéries sont trop petites et leur coloration n'est pas visible avec cette méthode.

Remarque : il faut bien focalisé les cellules en différents profondeurs, pour bien visualiser leur coloration avec le bleu de méthylène.

5.5.2 Principe

Le bleu de méthylène est transformé en son dérivé incolore par l'activité réductrice des cellules de levure viables. Les cellules de levure mortes seront colorées en bleu.

La viabilité est calculée à partir du rapport entre le nombre de cellules viables et le nombre de cellules total. La méthode surestime la viabilité "réelle" lorsque les cellules viables représentent moins de 80 % du nombre de cellules total, car elle ne distingue pas les cellules "vivantes" des cellules aptes à se reproduire (Cellules viables mais non cultivables).

Si la concentration en sucre est supérieure à 100 g/l, la plupart des cellules sont bleu clair, cette méthode est donc déconseillée.

Dans le cas d'un vin à faible pH et fortement tamponné, le colorant ne peut pas opérer correctement. Dans ce cas, la numération doit être appliquée au moins à la première dilution décimale.

5.5.3 Réactifs et produits

Solution A : Bleu de méthylène, en solution dans de l'eau distillée, 0,1 g/500 ml.

Solution B : KH_2PO_4 , en solution dans de l'eau distillée, 13,6 g/500 ml.

Solution C : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, en solution dans de l'eau distillée, 2,4 g/100 ml

Solution D : 498,75 ml de solution B + 1,25 ml de solution C.

Solution E : Mélanger les 500 ml de solution D aux 500 ml de solution A pour obtenir la solution tamponnée finale de bleu de méthylène d'un pH approximatif de 4,6.

5.5.4 Installations et équipement

Microscope, avec grossissements de 250-500 x. Le contraste de phase est contre-indiqué.

Lames de microscope et lamelles couvre-objets, ou hémocytomètre (cellule de Thoma, de Bürker ou de Neubauer).

Tube à essai et agitateur.

Pipettes à bout fin.

5.5.5 Méthodes d'examen

Détermination de la viabilité

Diluer la suspension de levure avec la solution de bleu de méthylène dans un tube à essais jusqu'à ce que la suspension comporte approximativement 100 cellules de levure dans un champ microscopique. Déposer une petite goutte de suspension bien mélangée sur une lame de microscope et la recouvrir d'une lamelle couvre-objets. Examiner au microscope sous un grossissement de 400 x, dans les 10 minutes suivant la mise en contact avec le colorant.

Compter un total de 400 cellules, en notant le nombre de cellules mortes, cassées, ratatinées et plasmolysées. Les cellules de levure en bourgeonnement sont comptées comme une seule cellule si la taille du bourgeon est inférieure à la moitié de celle de la cellule mère. Si la taille du bourgeon est égale ou supérieure à la moitié de celle de la cellule mère, les

deux cellules sont comptées. Les cellules de couleur bleu clair doivent être considérées vivantes.

5.5.6 Expression des résultats

Si T est le nombre total de cellules et C le nombre de cellules colorées en bleu, alors le pourcentage des cellules viables est $\frac{T - C}{T} \times 100$

5.5.7 Références

European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC.
Fachverlag Hans Carl, 2001

6. DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES PAR CULTURE

Objectif :

Le dénombrement des micro-organismes par culture a pour but d'évaluer le niveau de contamination de l'échantillon, c'est-à-dire d'estimer la quantité de micro-organismes cultivables. Selon les milieux de culture utilisés et les conditions de culture, quatre types de micro-organismes peuvent être dénombrés : levures, bactéries lactiques et bactéries acétiques et moisissures.

Principe :

Le dénombrement par culture est basé sur le fait que les micro-organismes vivants sont capables de se multiplier en milieu nutritif et conditions d'incubation appropriés pour former des colonies sur le milieu solidifié par de la gélose, ou un trouble dans le milieu liquide. Sur milieu gélosé une cellule produit par multiplication un amas de cellules visible à l'œil nu appelé colonie.

6.1 Détection, différenciation et dénombrement des micro-organismes (numération sur plaque).

6.1.1 Champ d'application

Cette norme formule des recommandations générales pour le dénombrement des levures, moisissures et bactéries lactiques et bactéries acétiques viables

dans les moûts, les moûts concentrés, les moûts partiellement fermentés, les vins (vins mousseux y compris) pendant leur élaboration et après la mise en bouteilles, par comptage des colonies cultivées sur un milieu solide après une incubation appropriée. Le but de l'analyse microbiologique est de contrôler le processus de vinification et d'éviter l'altération microbienne des moûts ou des vins.

6.1.2 Termes et définitions

Les termes "plaque" et "boîte de Petri" sont employés comme synonymes.
UFC = Unités formant colonies.

6.1.3 Méthode

Le nombre de micro-organismes viables présents dans des moûts ou des vins est déterminé en étalant un petit volume connu d'échantillon à la surface d'un milieu de culture ou en l'ajoutant selon la méthode de incorporation (voir 6.1.7.4), et en laissant incuber les plaques le temps nécessaire, dans les conditions les plus favorables à la croissance. Chaque cellule, ou groupe de cellules, se divise et se rassemble en un groupe qui devient visible en tant que colonie. Le nombre de colonies présentes à la surface d'une plaque est une indication du nombre de cellules présentes dans l'échantillon original. Les résultats sont par conséquent exprimés en UFC. Si le nombre de cellules dans un échantillon est censé être élevé, des dilutions décimales en série sont réalisées afin d'obtenir un nombre de colonie compris entre 10 et 300 par plaque. Si le nombre d'UFC dans un échantillon est censé être bas, elles sont collectées sur un filtre stérile de 0,45 à 0,88 µm pour les levures et 0,22 à 0,45 µm pour les bactéries, qui est ensuite placé dans la boîte de Petri sur la surface du milieu de culture.

La plage de mesure de cette méthode va de < 1 UFC/ (volume analysé) à 10^9 UFC/ml ou 10^{10} UFC/g dans l'échantillon original.

6.1.4 Réactifs et produits

Ceux indiqués au paragraphe 1 de la résolution, plus :

- Tubes (16x160 mm ou équivalents), contenant 9 ml d'eau peptonée stérile (Tryptone : 1 g/l) ou d'autres diluants à utiliser pour la dilution des échantillons (Annexe 4). Le nombre indicatif de tubes nécessaires pour les échantillons suivants est précisé ci-dessous :

Moûts non fermentés : 4 / échantillon.
Moûts de fermentation : 7 / échantillon.
Vins stockés : 2 / échantillon.

- Micropipette à bouts stériles : 1 ml et 0,2 ml.
- Tiges de verre coudées en L ou de forme triangulaire (tiges de Digralsky) ou étaleurs en plastique.

Boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (avec 15-20 ml de milieu de culture) (56 cm²) pour la technique sur plaques, et de 90 mm ou 60 mm (avec 6-8 ml de milieu de culture) pour la technique de filtration sur membrane, remplies 18-24 h à l'avance avec 15-20 ml de milieu de culture (simple ou en dupliqué boîtes sont nécessaires pour chaque échantillon testé) :

Pour le comptage des levures et moisissures, utiliser : YM, YEPD, gélose nutritive WL, gélose à levure ou gélose TGY (trypticase-glucose-extrait de levure) ou équivalent si validé. Plaques de gélose de lysine et de gélose différentielle WL (annexe 1) ou équivalent si validé en cas de recherche de levures non *Saccharomyces*. (Annexe 5 milieux de culture)

- Pour le comptage des bactéries acétiques, utiliser : Gélose GYC, milieu G2 ou Kneifel (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalent si validé
- Pour le comptage des bactéries lactiques, utiliser : MRS additionné de 20 % de jus de tomate (ou de pomme ou de raisin), ou gélose ATB (bouillon de tomate acide) modifiée (milieu pour *Oenococcus oeni*), ou bouillon de jus de tomate (TJB) plus gélose, ou milieu Lafon-Lafourcade, milieu 104 ou gélose MTB (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalent si validé
- Pour le comptage des champignons filamenteux, utiliser de la gélose Czapek-Dox modifiée, de la gélose DRBC (dichloran-rose Bengale-chloramphénicol) ou de la MEA additionnée de tétracycline (100 mg/l) et de streptomycine (100 mg/l) (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalent si validé
- Il convient d'ajouter des antibiotiques pour effectuer un comptage sélectif, étant donné que tous les micro-organismes sont présents ensemble dans le vin. (Voir Annexe I milieux de culture)

6.1.5 Installations et équipement

Comme indiqué au paragraphe 2 de la résolution.

6.1.6 Échantillonnage

Comme indiqué au paragraphe 3 de la résolution

Les quantités suivantes d'échantillons sont exigées pour la numération sur plaques :

Moût ou moût en fermentation ou vin stocké : pas moins de 250 ml ;

Vin en bouteille ou conditionné : pas moins d'une unité, quelle que soit la capacité ;

6.1. 7 Méthodes d'examen

6.1.7.1 Conditions préalables requises

Tous les produits et équipements utilisés au cours des essais doivent être stériles, et des conditions aseptiques doivent être maintenues tout au long des opérations.

La hotte à flux laminaire doit être mise en marche 5 minutes avant de commencer le travail, afin d'avoir un flux d'air stérile et stable.

6.1.7.2 Stérilisation

Les milieux de culture doivent être stérilisés en autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes (20 minutes pour de grands volumes). Le matériel et la verrerie stériles à usage unique doivent être ouverts et utilisés sous la hotte à flux laminaire. Les brucelles et les étaleurs doivent être plongés dans l'éthanol et flambés avant utilisation. Les entonnoirs en acier inoxydable doivent être flambés avec de l'éthanol après chaque utilisation. Les entonnoirs en verre et en polycarbonate doivent en revanche être passés à l'autoclave avant utilisation, leur nombre doit par conséquent être égal à celui des échantillons à tester.

6.1.7.3 Dilution des échantillons (Annexe 1)

Un ml d'échantillon est introduit à la pipette dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonée stérile. Le tube est mis en agitation pendant 20 secondes au moyen d'un agitateur vortex. C'est la première dilution (décimale), dont 1 ml est transféré dans le tube suivant de 9 ml d'eau peptonée stérile, ce qui constitue la deuxième dilution. Après 20 secondes d'agitation, l'opération est répétée autant de fois que nécessaire.

Le nombre indicatif de dilutions en série nécessaires pour les échantillons suivants est indiqué ci-dessous :

Moûts non fermentés : 4

dilutions décimales.

Moûts de fermentation : 7

dilutions décimales.

Vins non-filtrés pendant le vieillissement (comptage des levures) 2
dilutions décimales.

Vins non filtrés pendant le vieillissement (comptage des bactéries lactiques) 6
dilutions décimales.

Vins filtrés ou vins conditionnés (mis en bouteille)
Auc une dilution.

Moûts concentrés Diluer 10 ml dans 100 ml d'eau peptonée
(ou 100 ml dans 1000 ml).

Les vins en bouteille ou filtrés, et les moûts concentrés après dilution dans de l'eau peptonée stérile, sont analysés selon la technique de filtration sur membrane.

6.1.7.4 Préparation des plaques

Les dilutions en série nécessaires sont préparées en fonction du nombre d'échantillons à étaler sur des plaques. De multiples dilutions en série peuvent être préparées, si un grand nombre d'échantillons doivent être étalés sur des plaques, mais toute dilution devra être utilisée dans un délai de 20 minutes.

Inoculer chaque plaque avec 0,1 ou 0,2 ml des trois dilutions les plus faibles ayant été préparées, en procédant comme indiqué ci-dessous :

Moûts non fermentés dilutions -2 ; -3 ; -4.

Moûts de fermentation dilutions -5 ; -6 ; -7.

Vins non filtrés pendant le vieillissement dilutions 0 ; -1 ; -2.

Dans le doute, inoculer un nombre plus élevé de dilutions, jamais un nombre inférieur.

Dans des conditions aseptiques (de préférence sous une hotte à flux laminaire), avec une tige de verre coudée stérile (tige de Digralsky) ou à usage unique, étaler l'échantillon à la surface des milieux de culture avant absorption du liquide (généralement en 1-2 minutes). Utiliser une nouvelle " tige de Digralsky " pour chaque plaque ou procéder en allant de l'échantillon le plus dilué jusqu'au moins dilué. Laisser les plaques quelques minutes sous le flux d'air stérile, jusqu'à ce que le liquide soit absorbé.

Note 1 : Le fait d'utiliser 0,2 ml au lieu de 0,1 ml, comme fréquemment indiqué, facilite l'étalement et prolonge le délai d'utilisation. Ces éléments doivent être pris en compte dans les calculs.

Note 2 : Pour le dénombrement des levures, le développement bactérien est inhibé en ajoutant 50 mg/l de chloramphénicol (ou équivalent si validé) au milieu de croissance, après passage dans l'autoclave, et le développement des moisissures en ajoutant 150mg/l de diphenyle (ou équivalent si validé).

Note 3 : Pour le dénombrement des bactéries lactiques, le développement des levures est inhibé en ajoutant de la natamycine (pimaricine) (0,1 g/l) (ou équivalent si validé) et le développement des bactéries acétiques par incubation anaérobie.

Note 4 : Pour le dénombrement des bactéries acétiques, le développement des levures est inhibé en ajoutant de la natamycine (pimaricine) (0,1 g/l) (ou équivalent si validé) et celui des bactéries lactiques par ajout de pénicilline (12,5 mg/l) (ou équivalent si validé). L'ajout d'antibiotiques est effectué après la stérilisation en autoclave.

Pour une recherche spécifique de levures non *Saccharomyces*, inoculer, comme indiqué précédemment, trois plaques de gélose de lysine et trois plaques de gélose différentielle WL avec les dilutions appropriées

- Méthode de incorporation (méthode alternative).

Préparer et stériliser 15 ml de milieu dans des tubes, et maintenir les tubes dans un bain d'eau (ou équivalent si validé) à 47 ± 1 °C.

Verser 1 ml d'échantillon ou de dilution dans une boîte de Petri vide.

Ajouter 15 ml de milieu de culture et remuer doucement la boîte de Petri, afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes dans la masse du milieu.

Laisser refroidir et se solidifier en plaçant les boîtes de Petri sur une surface horizontale fraîche (le temps de solidification de la gélose ne devra pas excéder 10 minutes).

6.1.7.5 Dénombrement avec concentration par filtration sur membrane

La porosité de la membrane doit être de 0,45 ou 0,8 µm pour le dénombrement des levures ; 0,2 ou 0,45 µm pour celui des bactéries. La surface de la membrane doit de préférence être quadrillée, afin de faciliter le dénombrement des colonies.

Les plaques, sur lesquelles sont placées les membranes, peuvent contenir un milieu nutritif gélosé ou un tampon, dans lequel le milieu sec est dispersé et qui doit être imbibé d'eau stérile juste avant utilisation. Certains fournisseurs proposent des plaques stériles contenant un tampon stérile, sur lequel sont versés juste avant utilisation 2 ml de milieu liquide stérile à usage unique.

Assembler le matériel de filtration de manière aseptique, et relier au système qui permettra de faire le vide.

Plonger les brucelles dans l'éthanol et les flamber : une fois la flamme éteinte, attendre quelques secondes et mettre la membrane, avec les brucelles, sur son support dans l'unité de filtration.

Avant d'ouvrir la bouteille, bien l'agiter, renverser le goulot et le plonger dans l'éthanol (1-2 cm), puis flamber pour le stériliser.

Prélever trois volumes de chaque échantillon : 10 ml avec une pipette stérile de 10 ml, 100 ml avec une éprouvette cylindrique stérile de 100 ml, et le reste directement de la bouteille si applicable. Pour filtrer, verser le vin dans l'entonnoir, puis activer le vide.

Lorsque la quantité de vin désirée a été filtrée, casser le vide, flamber les brucelles, ouvrir l'entonnoir, maintenir la membrane avec les brucelles, placer sa face opposée sur le milieu solide d'une plaque et la faire adhérer à la surface du milieu en évitant que des bulles ne se forment en-dessous.

6.1.7.6 Incubation des échantillons

Incuber les plaques à l'envers, en conditions aérobie, pour les levures ou pour les bactéries acétiques, pendant 4 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Si la température est inférieure à 23°C , prolonger l'incubation d'un jour, si elle est inférieure à 20°C prolonger de trois jours supplémentaires. La température maximale ne doit pas excéder 28°C .

En cas de comptage portant sur des levures *Brettanomyces* (ou *Dekkera*), doubler le temps d'incubation.

En cas de comptage de BL (bactéries lactiques), mettre les plaques dans une fiole ou un sac anaérobies, et incuber les plaques à l'envers pendant 10 jours à $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Si la température est inférieure à 28°C prolonger l'incubation

d'un jour ; si elle est inférieure à 25°C, prolonger de trois jours supplémentaires. La température maximale ne doit pas excéder 33°C.

6.1.8 Expression des résultats

6.1.8.1 Dénombrement des colonies de levure et bactéries :

Compter les colonies développées en 4 jours pour les levures et les bactéries acétiques (8 jours pour les levures *Brettanomyces/Dekkera*), et 10 jours pour les bactéries lactiques au besoin à l'aide d'un compteur de colonies, en ignorant la morphologie différente des colonies en cas de comptage total des levures, ou en la prenant en compte s'il y a lieu.

Les milieux et les conditions d'incubation sont suffisamment spécifiques pour que les colonies visibles à l'œil nu permettent le comptage des différents types de micro-organismes.

6.1.8.2 Calcul des résultats.

Les résultats les plus fiables proviennent du comptage de plaques contenant de 10 à 300 colonies (ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques).

Calculer le nombre N de micro-organismes présents dans l'échantillon d'essai sous forme de moyenne pondérée de deux dilutions décimales successives, en utilisant l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

où :

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes conservées après deux dilutions décimales successives, dont une au moins contient au minimum 10 colonies.

V est le volume d'inoculum placé dans chaque boîte, en millilitres.

d est la dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 quand le produit liquide non dilué (échantillon d'essai) est retenu].

En d'autres termes, si les plaques de deux dilutions décimales consécutives contiennent 10-300 colonies, calculer le nombre d'UFC/ml pour chaque

dilution, et ensuite la moyenne des deux valeurs : c'est la valeur d'UFC/ml de l'échantillon. Si une valeur est supérieure au double de l'autre, garder la valeur inférieure comme UFC/ml.

Arrondir les résultats au deuxième chiffre significatif seulement au moment de la conversion en UFC/ml, et rapporter les résultats sous la forme d'un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multipliés par la puissance 10 appropriée (ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques).

Si les échantillons ont été inoculés en double, et si une ou deux plaques inoculées avec la même dilution contiennent des colonies, calculer le nombre moyen de colonies et multiplier par l'inverse du facteur de dilution, pour obtenir le nombre d'UFC/ml.

Si aucune plaque ne contient 10-300 colonies, et que toutes les plaques contiennent plus de 300 colonies, compter celles comportant le moins de colonies. Si elles contiennent moins de 10 colonies/cm², compter 12 carrés de 1 cm² et multiplier la moyenne par 56 (la surface d'une plaque de 90 mm de diamètre) ; si les colonies sont plus denses, compter 4 carrés de 1 cm² et multiplier la moyenne par 56. Exprimer les résultats en tant que "Valeur UFC/ml estimée". Dans la mesure du possible, ne pas rapporter les résultats sous la forme TNTC [too numerous to count (trop nombreux pour être comptés)].

Si les seules plaques présentant des colonies contiennent moins de 10 colonies, mais au moins 4, calculer le résultat comme indiqué dans le cas général, et le rapporter en tant que "Valeur UFC/ml estimée".

Si le total est compris entre 3 et 1, la précision du résultat est trop faible, et le résultat sera rapporté sous la forme "(les micro-organismes recherchés) sont présents mais en quantité inférieure à $4 \times d$ UFC/ml".

Si les plaques de toutes les dilutions d'un échantillon ne présentent aucune colonie, rapporter le résultat sous la forme "moins de 1/d UFC/ml", mais tenir compte de la présence éventuelle d'inhibiteurs dans l'échantillon.

En cas d'application de la technique de filtration sur membrane, exprimer les résultats par rapport à la quantité de liquide filtrée, par exemple UFC/bouteille, UFC/100 ml ou UFC/10 ml.

6.1.9 Incertitude de la mesure

6.1.9.1 Critères de contrôle des résultats.

Pour chaque lot de milieu, une plaque est utilisée comme témoin de stérilité après stérilisation. Une plaque, par milieu de culture utilisé lors des tests, est laissée ouverte sous la hotte à flux laminaire tout au long des opérations afin de contrôler la stérilité de l'environnement de travail. Cette plaque sera incubée comme les plaques inoculées.

Périodiquement, un échantillon est inoculé en double, et le K_p expérimental est calculé au moyen de l'équation suivante :

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}}$$

dans laquelle C_1 et C_2 sont les résultats des deux comptages.

Si $K_p < 1,96 \approx 2,0$ les résultats sont acceptables : la moyenne des deux comptages peut être utilisée comme résultat.

Si $2,0 < K_p \leq 2,576 \approx 2,6$ la différence des deux comptages est critique et doit être soigneusement évaluée avant d'accepter les résultats comme moyenne des deux comptages.

Si $K_p > 2,6$ la différence des deux comptages est anormale. Le résultat est rejeté et le test doit être répété. Dans ces circonstances, le responsable du laboratoire doit examiner tous les résultats obtenus après les derniers résultats acceptables.

6.1.9.2 Incertitude de la mesure

Si le nombre de colonies comptées sur la plaque pouvant l'être est inférieur à 10, le résultat est acceptable, mais la population des colonies est considérée conforme à la loi de Poisson. Le niveau de confiance de 95 %, et par conséquent l'incertitude de la mesure du comptage estimatif réalisé sur une seule boîte de Petri, est rapporté dans le tableau suivant.

RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV
Analyse microbiologique des vins et des moûts

Nombre de colonies	Limite de confiance au niveau 95 %		Pourcentage d'erreur de la limite *	
	Inférieure	Supérieure	Inférieure	Supérieure
1	<1	6	-97	457
2	<1	7	-88	261
3	<1	9	-79	192
4	1	10	-73	156
5	2	12	-68	133
6	2	13	-63	118
7	3	14	-60	106
8	3	16	-57	97
9	4	17	-54	90
10	5	18	-52	84
11	6	20	-50	79
12	6	21	-48	75
13	7	22	-47	71
14	8	24	-45	68
15	8	25	-44	65

* Par rapport au dénombrement des micro-organismes (1^{ère} colonne)

Si le nombre de colonies est > 10, la limite de confiance à un seuil de probabilité p est calculée au moyen de l'équation suivante :

$$C = C_i \pm K_p \sqrt{C_i},$$

dans laquelle C_i est le nombre de colonies de la plaque, et K_p est le facteur de couverture. Généralement, le facteur de couverture est 2 ou 1,96. La valeur de C est calculée à partir de chaque plaque et multipliée par le nombre de dilutions ainsi que par le résultat du comptage.

6.2. Culture en milieu liquide - "nombre le plus probable" (NPP)

6.2.1 Objectif

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

6.2.2 Principe

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

6.2.3 Diluants et milieux de culture liquides (Annexes 4 et 5)

6.2.4 Mode opératoire

Plusieurs solutions quantitatives et successives sont préparées et, après incubation, une certaine proportion d'essais ne donneront lieu à aucun développement (essais négatifs), tandis que d'autres commenceront à se développer (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 appropriées (tables reposant sur les calculs de probabilité de McCrady) et d'extrapoler ce résultat à l'échantillon initial.

6.2.5 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 l'ajouter à 9 ml de diluant dans le deuxième tube. Continuer ce protocole de dilution jusqu'à la dernière dilution requise, selon la population microbienne présumée, en utilisant des pipettes

stériles pour chaque dilution. Les dilutions doivent être réalisées jusqu'à extinction, c'est-à-dire l'absence de développement dans les dilutions les plus faibles (*annexe 2*).

6.2.6 Préparation des inoculations

Inoculer 1 ml de vin et 1 ml de chacune des dilutions homogénéisées lors de leur préparation, dans trois tubes avec le milieu de culture approprié (*annexe 5*). Bien mélanger.

Incuber les tubes inoculés dans l'étuve à 25 °C, pour les levures (pendant 3 à 10 jours), en aérobiose et, pour les bactéries lactiques, en anaérobiose ou microaérophilie (pendant 8 à 10 jours), en faisant des observations périodiques jusqu'au dernier jour d'incubation.

6.2.7 Résultats

Sont considérés positifs tous les tubes qui présentent un développement microbien se traduisant par la formation d'un sédiment blanchâtre, plus ou moins évident et/ou par un trouble plus ou moins accentué. Les résultats doivent être confirmés par observation au microscope. Préciser la durée d'incubation.

La lecture des tubes se fait en notant 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, seuls 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" conformément aux exemples figurant dans le tableau suivant :

Tableau

Exemple	Nombre de tubes positifs pour chaque dilution					Nombre caractéristique
	10	10	10	10	10	
a	3	3	3	1	0	3-2-0
a	3	3	2	0	0	3-2-1
a	3	2	1	0	0	3-0-1
a	3	0	1	0	0	3-2-3
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)

Le NPP est déterminé à l'aide du Tableau A (Annexe 3) reposant sur les calculs de probabilités de McCrady, en tenant compte du nombre caractéristique obtenu et de la dilution effectuée. Si la série de dilutions est $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}$, la lecture est directe. Si la série de dilutions est $10^1, 10^0, 10^{-1}$, la lecture correspond à 0,1 fois cette valeur. Si la série de dilutions est $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$, la lecture correspond à dix fois cette valeur.

Remarque :

S'il est nécessaire d'augmenter le niveau de détection, une concentration de vin de 10^1 peut être utilisée. Pour obtenir cette concentration de micro-organismes dans 1 ml, centrifuger 10 ml de vin et prélever 1 ml de dépôt (après avoir enlevé 9 ml du liquide surnageant) à inoculer selon la procédure décrite précédemment.

6.2.8 Expression des résultats

La teneur en micro-organismes du vin doit être présentée en germes par millilitre, en notation scientifique à une décimale. Si la teneur est inférieure à 1,0 cellule par millilitre, le résultat doit être présenté sous la forme " $< 1,0$ cellule par ml".

(voir les annexes en pages suivantes)

7. Bibliographie

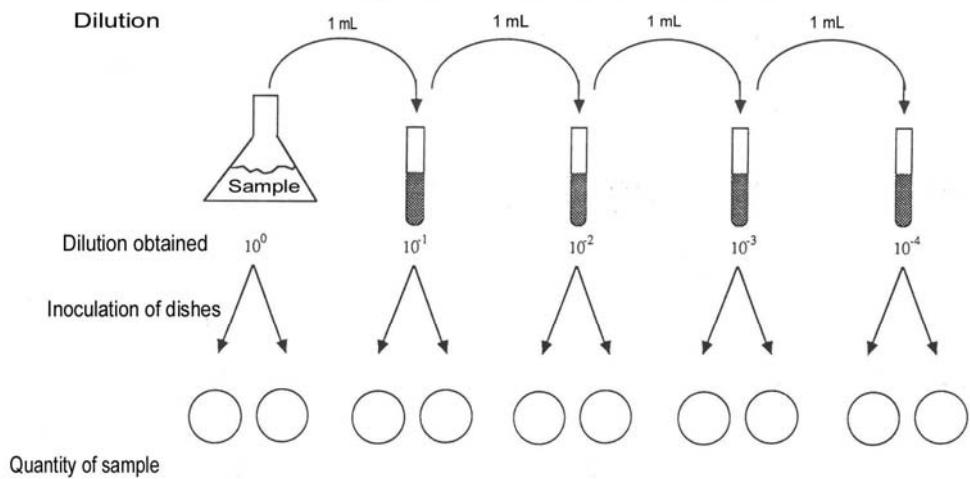
- ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal medium for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C.
- ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations.
- ISO 7667:1983. Microbiology - Standard layout for methods of microbiological examination.
- Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203 ;
- A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora micròbica di mosti e vini. VigneVini, 9-1992 17-20.- ANDREWS, W. et MESSEY, J. (1990). Microbiological Methods. in : AOAC Official

RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV
Analyse microbiologique des vins et des moûts

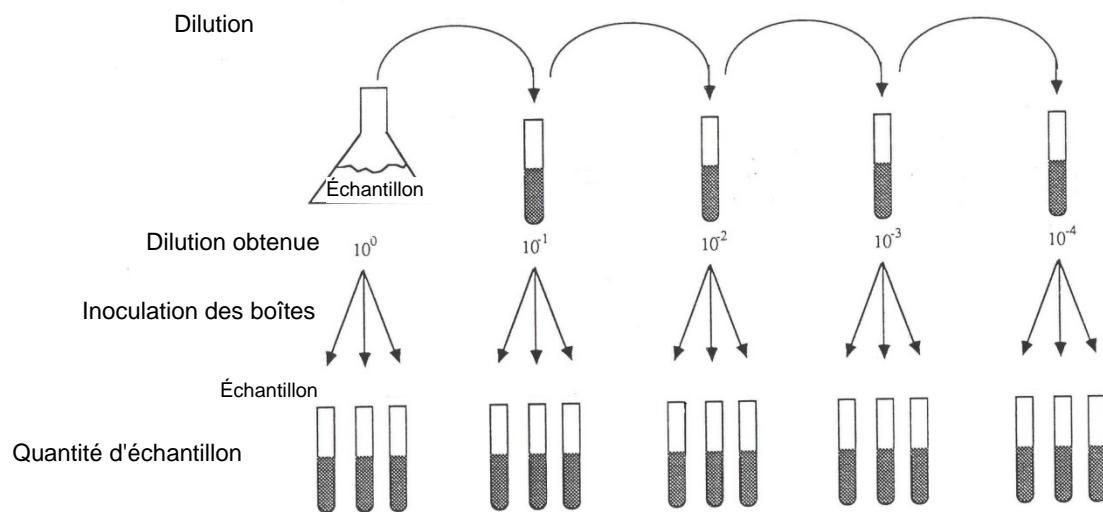
- Methods of Analysis, 15th edition, 1, 425-497, Association of Analytical Chemist, Washington.
- BIDAN, P. (1992). Analyses Microbiologiques du Vin. F.V. O.I.V. n° 910, Paris.
 - BOURGEOIS, C.M. et LEVEAU, J.Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, 2ème édition, 3. Le Contrôle Microbiologique Lavoisier, Tec. & Doc., APRIA Ed. Paris.
 - CARR, J. G. (1959). Acetic acid bacteria in ciders. Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta., 160.
 - DE MAN, J. C. (1975). The probability of most probable number. European Journal of Applied Microbiology, 1, 67-78.
 - 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.
 - MAUGENET, J. (1962). Les Acétobacter du cidre. Identification de quelques souches. An. Technol. Agric., 11, 1, 45-53.
 - PLARIDIS et LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Contrôle microbiologique des vins. Bull. O.I.V., 618, 433-437, Paris.
 - RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E. (2004). Traité d'Œnologie, Tome 2, Librairie Polytechnique CH. Béranger, Paris et Liège.
 - Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1976). 14th edition, American Public Health Association, Incorporated, New York.
 - Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1985). 16th edition, American Public Health Association, DC 20005, Washington.
 - 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. n° 987, Paris.
 - 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.
 - 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.

Annexe 1

Préparation des dilutions et inoculations



Annexe 2
Préparation des dilutions et inoculations



Annexe 3
TABLEAU A

"Nombre le plus probable" (NPP) pour 1 ml d'échantillon en utilisant 3 tubes
 contenant 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml

Tubes positifs				Tubes positifs				Tubes positifs			
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	NPP 1 ml	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	NPP 1 ml	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	NPP 1 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				

Adapté de " Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water " (1976)

Annexe 4

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 8,5 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 1000 ml. Après dissolution dans l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Filtrer. Répartir 9 ml dans les tubes à essais. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

2. Solution de Ringer à 1/4

Préparation : dans une fiole jaugée de 1000 ml, peser 2,250 g de chlorure de sodium, 0,105 g de chlorure de potassium, 0,120 g de chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,050 g d'hydrogénocarbonate de sodium. Après dissolution dans de l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Répartir 9 ml dans les tubes à essais. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 15 mn à 121 °C. (cette solution est disponible dans le commerce)

3. Eau peptonée

Préparation : dans une fiole jaugée de 1000 ml, peser 1g de peptone. Après dissolution dans l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Répartir 9 ml dans les tubes d'essai. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

Annexe 5

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 de culture solides

En l'absence d'indication contraire, le pH de tous les milieux doit être ajusté entre pH 5,5 et pH 6,0

1 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES LEVURES

1.1 YM

Glucose	50 g
Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Agar agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien et 150 mg de diphenyle pour inhiber le développement des moisissures.

1.2 YEPD

Glucose	20 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Agar agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien et 150 mg de diphenyle pour inhiber le développement des moisissures.

1.3 Gélose nutritive WL

Glucose	50 g
Peptone	5 g
Extrait de levure	4 g
Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)	0,55 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,425 g
Chlorure de calcium (CaCl_2)	0,125 g
Sulfate de magnésium (MgSO_4)	0,125 g
Chlorure ferrique (FeCl_3)	0,0025 g
Sulfite de manganèse (MnSO_4)	0,0025 g
Vert de bromocrésol	0,022 g
Gélose bactériologique	12 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	5,5

La gélose différentielle est produite en ajoutant 4 mg/l de cycloheximide à la gélose nutritive WL.

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien.

1.4 Gélose de lysine ASBC

Solution A :

Base carbonée de levure	2,35 g
Eau : jusqu'à	100 ml

Stériliser par filtration sur membrane.

Solution B :

Lysine-HCl	0,5 g
Agar agar	4 g
Eau : jusqu'à	100 ml

Stériliser pendant 20 mn à 121 °C.

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien.

2 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES LACTIQUES

2.1 M.R.S. + jus de tomate (ou pomme).

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Extrait de bœuf	8 g
Extrait de levure	4 g
Phosphate de potassium, dibasique (KH_2PO_4)	2 g
Acétate de sodium · 3H ₂ O	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium · 6H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse · 4H ₂ O	0,05 g
"Tween 80"	1 ml
Agar-agar	12 g
Jus de tomate (ou jus de pomme ou de raisin)	200 ml
Eau jusqu'à	1000 ml
Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.	

2.2 Gélose au jus de tomate

Jus de tomate (extrait sec de 400 ml)	20 g
Peptone	10 g
Lait peptonisé	10 g
Agar-agar	14 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	6,1
Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.	

2.3 Milieu ATB modifié, ou milieu *Oenococcus oeni* (anciennement milieu *Leuconostoc oenos*).

Solution A :

Glucose	10 g
Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,050 g
Jus de tomate (ou jus de pomme ou de raisin)	250 ml
Agar agar	12 g
Eau	750 ml

Stériliser à l'autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

Solution B :

Cystéine HCl	1 g
Eau : jusqu'à	100 ml
pH	4,8

Stériliser par filtration sur membrane.

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, juste avant utilisation.

Ajouter 1 ml de la solution B dans 20 ml de solution A au moment de l'utilisation

2.4 Milieu Lafon-Lafourcade

Glucose	20 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de bœuf	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de tri-ammonium	2 g
Sulfate de magnésium · 6H ₂ O	0,2 g
Sulfate de manganèse · 4H ₂ O	0,05 g
"Tween 80"	1 ml
Agar agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	5,4

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.5 Milieu Dubois (milieu 104)

Jus de tomate	250 ml
Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
Acide malique	3 g
Sulfate de magnésium · 6H ₂ O	0.05 g
Sulfate de manganèse · 4H ₂ O	0.05 g
Agar agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	4,8

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.6 MTb.

Glucose	15 g
Poudre Lab-Lemco (Oxoid)	8 g
Caséine hydrolysée	1 g
Extrait de levure	5 g
Jus de tomate	20 ml
Acétate de sodium	3 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acide malique	6 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,035 g
"Tween 80"	1 mg
TC Vitamins Minimal Eagle, 100x (BD-Difco)	10 ml *
pH (avec KOH)	5,0
Eau jusqu'à	1000 ml

* à ajouter après stérilisation.

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES ACÉTIQUES

3.1 GYC

Glucose	50 g
Extrait de levure	10 g
Carbonate de calcium (CaCO ₃)	3 g

Gélose	25 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimarcine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3.2 Milieu G2

Extrait de levure	1,2 g
Phosphate d'ammonium	2 g
Jus de pomme	500 ml
Gélose	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	5,0

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimarcine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3.3 Milieu Kneifel

Extrait de levure	30 g
Éthanol	20 ml *
Gélose	20 g
Vert de bromocrésol à 2,2 %	1mL
Eau : jusqu'à	1000 ml

* à ajouter après stérilisation.

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimarcine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

Colonies bleues : *Acetobacter, Gluconacetobacter*

Colonies vertes : *Gluconobacter*

4 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES MOISSURES

4.1 Czapek-Dox, Modifié

Sucrose	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01g
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	7,3 ± 0,2

Ajouter 10 mg/l de cycloheximide pour inhiber le développement des levures (le développement des levures résistantes au cycloheximide est généralement plus lent que celui des moisissures).

Remarque : Ce milieu permet la croissance uniquement des moisissures se développant en présence de nitrates.

Ajouter de la tétracycline (100 mg/l) et de la streptomycine (100 mg/l) pour inhiber la croissance des bactéries.

4.2 Gélose dichloran-rose Bengale-chloramphénicol (gélose DRBC)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Rose Bengale	0,025 g
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)	0,002g
Solution de chloramphénicol (0,1 g/10ml) *	10 ml
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	5,6 ± 0,2

* À ajouter après stérilisation.

4.3 Gélose à l'extrait de malt (MEA)

Glucose	20 g
Extrait de malt	20 g
Peptone	5 g
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	5,5 ± 0,2

Ajouter de la tétracycline (100 mg/l) et de la streptomycine (100 mg/l) pour inhiber la croissance des bactéries.

2. Milieux de culture liquides

2.1. Pour les levures

Milieu YEPD (extrait de levure, peptone, dextrose) + chloramphénicol

Préparation : Peser 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 avec de l'eau jusqu'à 1000 ml et mélanger.

Verser des portions de 5 ml de ce milieu dans les tubes et placer en autoclave pendant 15 mn à 121 °C.

2.2. Pour les bactéries lactiques

Milieu MTJ (50 % de milieu MRS "bouillon pour lactobacilles selon Man, Rogosa et Sharpe" + 50 % de milieu TJB "bouillon de jus de tomate") + actidione

Préparation : Peser 27,5 g de MRS "bouillon pour lactobacilles selon Man, Rogosa et Sharpe" (Difco ou équivalent). Ajouter 500 ml d'eau, porter à ébullition pour permettre la dissolution totale et ajouter 20,5 g de TJB "bouillon de jus de tomate" (Difco ou équivalent). Ajouter 50g 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.

Verser des parties de 10 ml de ce milieu³⁾ dans les tubes et placer en autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

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

ANEXE 6 : IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES SPÉCIFIQUES

6.1 Identification de colonies de levure sur gélose nutritive WL.

L'utilisation de ce milieu ne prétend pas constituer une méthode d'identification des espèces, mais peut offrir aux laboratoires non spécialisés un moyen rapide et bon marché de prévoir le genre des levures viables et cultivables. Après incubation de 4 jours, évaluer la morphologie des colonies comme suit (Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills et L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203 ; A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora micobica di mosti e de vini. Vignevini, 9-1992 17-20) :

- ***Saccharomyces spp.*** : Se développe bien en 4 jours sur gélose nutritive WL, en formant des colonies circulaires de couleur crème à légèrement verdâtre. Les différentes nuances de couleur n'indiquent pas nécessairement la présence de différentes souches, mais la présence de légères mutations ; les colonies présentent une protubérance, ont une surface lisse et mate, et leur consistance est butyreuse. Ne se développe pas sur la gélose de lysine.
- ***Torulaspora spp.*** : Les colonies sont semblables à celles de *Saccharomyces spp.* Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Hanseniaspora spp. (Kloeckera spp.)*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies plates, lisses et butyreuses de couleur vert foncé. Se développe sur la gélose de lysine et sur la gélose différentielle WL.
- ***Candida stellata*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies vert pois, lisses et butyreuses qui, avec le temps, deviennent plus foncées au centre. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Saccharomycodes spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies convexes, lisses et butyreuses de couleur vert clair. Se développe sur la gélose de lysine, pas sur la gélose différentielle WL.

Remarque : Ses cellules, observées au microscope, sont très grandes (jusqu'à 25 µm).

- ***Schizosaccharomyces pombe*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies lisses, de la taille d'une pointe d'aiguille et de couleur vert foncé. Se développe sur la gélose de lysine.
Remarque : Ses cellules, observées au microscope sont facilement identifiables en raison de leur division caractéristique par scission.
- ***Rhodotorula spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies butyreuses, à la surface lisse et muqueuse, et de couleur rose foncé. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Metschnikowia spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant de petites colonies claires, lisses et butyreuses. Un pigment rougeâtre se répand dans le milieu au-dessous des colonies. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Pichia membranifaciens*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies convexes, à la surface grossière et pulvérulente, et de couleur grisâtre ou bleuâtre. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Pichia anomala* (anciennement *Hansenula anomala*)** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies de couleur crème ou bleuâtre, nettement bleuâtre après 8 jours. Les colonies circulaires, à la surface lisse ont une consistance butyreuse mais parfois clairement muqueuse. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Dekkera spp.* ou *Brettanomyces spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 8 jours, donnant de petites colonies lisses et butyreuses, en forme de dôme et de couleur crème. Produit une grande quantité d'acide acétique, nettement perceptible à l'odeur, qui fait virer le milieu au jaune. Se développe sur la gélose de lysine et sur la gélose différentielle WL. La croissance sur ce dernier milieu permet de la distinguer de *Zygosaccharomyces bailii*.
Remarque : Une confirmation est possible par examen microscopique : Dekkera possède des cellules de petite taille, dont certaines ont une forme ogivale caractéristique.
- ***Zygosaccharomyces bailii*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant de petites colonies lisses et butyreuses, de forme circulaire et de couleur crème. Se développe sur la gélose de lysine mais pas sur la gélose différentielle WL. Un halo jaunâtre est souvent présent autour des jeunes colonies.
Remarque : en cas de développement dans du vin mis en bouteille, produit des groupes bruns de 0,5 - 1 mm. Ses cellules ne sont pas de forme ogivale.

- **Bactéries acétiques** : Se développent sur la gélose nutritive WL, en donnant des colonies brillantes et intensément vertes, d'une taille allant de petite à celle d'une pointe d'aiguille, et qui sont fortement positives au test à la catalase. (*Remarque – ce milieu n'est pas approprié à leur comptage*).
- **Bactéries lactiques** : Se développent sur la gélose nutritive WL en 10 jours, en donnant des colonies catalase-négatives claires de la taille d'une pointe d'aiguille. (*Remarque – ce milieu n'est pas approprié à leur comptage*).

6.2 Identification des colonies de bactéries lactiques.

Les colonies de BL sont translucides et d'une taille allant de celle d'une pointe d'aiguille à quelques mm. Elles sont à Gram-positif et catalase-négatives. *Oenococcus oeni* se développe sous forme de courtes chaînes, les pédioocoques forment des tétrades et diplocoques, les lactobacilles forment des bacilles longs ou courts.

6.3 Identification des colonies de bactéries acétiques.

Les colonies de BA sont catalase-positives et à Gram négatif, et sont fortement acidogènes : ceci se traduit par une zone claire autour de leurs colonies dans les milieux contenant du carbonate de calcium ou par une couleur différente si le milieu contient un indicateur de pH. Leurs cellules sont des coques ou des bacilles, en général légèrement plus grandes que celles des BL.