

# Contrôles microbiologiques

<b>1 ■ MICROBES UTILES ET GERMES DE CONTAMINATION</b>	381
<b>2 ■ POINTS DE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE</b>	381
<b>3 ■ PRATIQUES ASEPTISÉES</b>	382
<b>4 ■ INSTALLATIONS SPÉCIFIQUES</b>	382
<b>5 ■ PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON EN CONDITION STÉRILE</b>	382
<b>6 ■ ESTIMATION DE LA VIABILITÉ D'UNE POPULATION DE LEVURES</b>	383
6.1. Comptage sur cellule de numération au microscope	383
6.2. Comptage sur boîte de Pétri	384
6.3. Comptage par épifluorescence	385
6.4. Interprétation du dénombrement d'une population de levures	385
<b>7 ■ DIAGNOSTIC HYGIÈNE PAR ATP-MÉTRIE</b>	386
<b>8 ■ DIAGNOSTIC DE LA PRÉSENCE DE <i>BRETTANOMYCES</i> DANS LES VINS PAR PCR</b>	387
<b>FICHES PRATIQUES</b>	388
<b>Microbiologie</b>	388
FP 46-1 Particularités du laboratoire de microbiologie	388
FP 46-2a Dilution d'un échantillon avant un contrôle microbiologique	389
FP 46-2b Filtration d'un échantillon sur membrane stérilisante	390
FP 46-3a Préparation d'une cellule de numération	391
FP 46-3b Caractéristiques techniques d'une cellule de numération	392
FP 46-3c Technique de comptage sur une cellule de numération	393
FP 46-3d Calculs sur une cellule de numération	394
FP 46-3e Tableau de collecte des résultats	395
FP 46-4 Interprétation du nombre de germes	396
FP 46-5 Ensemencement et comptage sur boîte de Pétri	397
FP 46-6 ATP-métrie – Appareil et fournitures	398
FP 46-7 ATP-métrie – Mode opératoire	399
FP 46-8 Traitement des résultats et diagnostic hygiène	400

## 1 ■ MICROBES UTILES ET GERMES DE CONTAMINATION

La transformation du raisin en vin, produit vivant par nature, fait appel à l'action successive de plusieurs microorganismes. On parle, à juste titre, de microbes utiles. Ce sont des levures, lors de la fermentation alcoolique et des bactéries lactiques, lors de la fermentation malolactique. Pourtant, une fois ces fermentations terminées, il est important que les populations microbiennes régressent le plus rapidement possible et de façon la plus complète possible ; c'est le rôle principal des opérations telles que le soutirage, le collage, la filtration, le sulfitage... Car, dès lors, ces mêmes germes peuvent être à l'origine d'altérations dans le vin. Parmi ces altérations, on peut citer :

- La **reprise de la fermentation alcoolique** par des levures *Saccharomyces cerevisiae* (qui réalise la fermentation alcoolique) ou *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharoycodes ludwigi* (qui ne participent normalement pas à la fermentation alcoolique) ; cet accident microbien était anciennement appelé « maladie de la pousse » ou « vin diable » car le vin redevenu effervescent poussait les bouchons en le faisant jaillir hors de son contenant sous la pression du gaz carbonique.
- La maladie de la **piqûre lactique**, lorsque la fermentation malolactique s'enclenche avant la fin de la fermentation alcoolique et que des bactéries lactiques (*Oenococcus oeni* ou certaines souches de *Lactobacillus*) dégradent les sucres fermentescibles.
- La **maladie de la graisse** (principalement due au *Pediococcus damnosus* ou au *Pediococcus parvulus*), la **tourne** ou encore la **maladie de l'amer** (provoquées par *Lactobacillus hilgardii* ou *Lactobacillus brevis*) ; ces altérations lactiques surviennent lorsque les bactéries lactiques sont maintenues dans le vin après la fin de la fermentation malolactique et dégradent, pour subsister dans le milieu, différents composés du vin autres que l'acide lactique, en provoquant une élévation de l'acidité volatile et l'apparition de divers désagréments : le vin devenant filant (graisse), ou totalement désacidifié (tourne) ou encore amer (amertume).

Aux côtés de ces germes, pour la plupart initialement utiles, se trouvent des **germes de contamination**. Ces microorganismes n'ont aucun rôle œnologique mais tirent profit du moindre facteur favorisant pour contaminer le vin et altérer ses qualités :

- **déséquilibre** dans la composition du vin : acidité totale faible, pH élevé, présence de sucres résiduels ;
- absence de protection antiseptique : absence ou insuffisance de SO<sub>2</sub> libre ;
- contact ou exposition prolongée du vin à l'oxygène : soutirage avec **aération**, cuve ou fût en **vidange** ;
- **température** de conservation élevée : supérieure à 16 °C ;
- manque d'**hygiène** dans le chai et lors des manipulations du vin.

Pour exemple, et sans promettre l'exhaustivité de la liste, nous citerons quelques catégories de germes de contamination et les altérations qu'ils produisent :

- chez les levures : *Brettanomyces* synthétise des éthyl-phénols (phénol volatil) responsables d'odeurs décrites comme « **écu-**

**rie** », « **sueur de cheval** » ; *Candida*, *Hansenula* ou *Pichia* sont trois levures oxydatives responsables de la maladie de la fleur avec production d'éthanal (odeur de pomme blette, due à *Candida*) ou production d'acétate d'éthyle (odeur de colle « scotch », due à *Hansenula*) ;

- chez les bactéries lactiques : diverses souches, sans distinction d'espèce, produisent des **amines biogènes** (tyramine et histamine, substances allergisantes) qui peuvent s'accumuler jusqu'à des teneurs jugées inacceptables pour certains marchés ; *Lactobacillus* synthétise des acétyl hydroxytryptamine à odeur de « **souris** » ;
- à la fois chez des levures et des bactéries, selon les souches et selon le raisin et ses traitements : la synthèse de **carbamate d'éthyle** (cancérogène à des doses souvent beaucoup plus fortes que celles rencontrées dans les vins) pose quelquefois des problèmes à l'exportation car les doses maximales varient d'un pays à l'autre ;
- chez les bactéries acétiques : *Acetobacter aceti* est responsable de la **piqûre acétique** marquée par l'odeur du vinaigre en raison de la forte teneur en acide acétique.

### Notes importantes :

À la différence de nombreux produits agroalimentaires, **aucun microbe du vin n'est pathogène**. C'est la raison pour laquelle, la stérilité (c'est-à-dire l'absence totale de germes) est rarement recherchée dans les vins. Pour autant, les Règlements CE 178/2002 et 852/2004 responsabilisent les entreprises sur leur maîtrise de la **sécurité alimentaire** qui induit la **mise en place d'autocontrôle** selon la méthode normalisée HACCP (hazard analysis critical control point = analyse des dangers et détermination des points critiques en vue de leur maîtrise). Le **guide des bonnes pratiques hygiéniques Filière Vins** (GBPH) est un document de référence, conçu par la branche professionnelle et d'application volontaire. Il constitue un outil précieux d'aide pratique à la mise en application de ces obligations réglementaires. **Dans le cadre d'une vinification maîtrisée et d'un élevage correctement suivi, les accidents microbiens sont rares.**

## 2 ■ POINTS DE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

Optimiser et garantir la qualité organoleptique du vin jusqu'à sa consommation exigent de concilier :

- des traitements du vin les plus modérés possibles ;
- des durées de conservation parfois très longues ;
- des conditions de transport et de stockage souvent mal contrôlées (notamment dans les circuits de distribution tels que les CHR (Cafés-Hôtels-Restaurants)), la grande distribution, l'export.

Dans cette perspective, la rigueur impose une surveillance microbiologique étroite et ce, à deux niveaux :

- d'une part, le **contrôle des populations** microbiennes du moût ou du vin ;

- d'autre part, le **diagnostic hygiène** : contrôle des surfaces en contact avec le moût et le vin.

Les contrôles microbiologiques des vins peuvent avoir lieu à tout moment au cours de l'itinéraire technique, dès lors qu'il y a un doute ou un signe alarmant tel que :

- une cinétique fermentaire anormale : ralentissement ou arrêt de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malolactique ;
- une élévation brusque et/ou excessive de l'acidité volatile ;
- une odeur suspecte évoquant par exemple l'un des descripteurs énoncés au paragraphe précédent.

Les stades de contrôles les plus fréquemment réalisés sont :

- **Sur moût, en cas de problème chronique durant la fermentation alcoolique** : à ce stade, si la population microbienne est trop faible ou si son taux de mortalité est trop élevé, cela peut conduire à des fermentations incomplètes. Si des germes d'altération colonisent le milieu, le vin peut subir des dommages irréversibles.
- **Sur vin en cours d'élevage et de conservation, en cas de suspicion d'une contamination microbienne** : à ce stade, toute hausse anormale de la population microbienne est un signe de contamination. En prendre connaissance permet :
  - de corriger rapidement le vin avant que les dégâts ne soient irréversibles ;
  - de corriger ses pratiques par une meilleure hygiène afin de limiter les contaminations ultérieures.
- **Sur vin fini et sur le matériel lors du chantier de mise en bouteille** : à ce stade, on va pouvoir s'assurer :
  - du respect du cahier des charges du client exigeant un vin pauvre en germes ;
  - de son engagement dans une démarche qualité.
 Selon la technique mise en place, le contrôle microbiologique permet :
  - de connaître la **quantité de germes** présents dans le moût ou le vin : ce sont les comptages de population ;
  - de connaître le niveau de **viabilité** d'une population : lors du comptage des populations, certaines techniques permettent de différencier les germes vivants des germes morts, permettant de se rendre compte du taux de viabilité de ces populations ;
  - d'isoler pour identifier la **nature des germes** : certaines techniques permettent de séparer pour les étudier et différencier les germes entre eux ; pour les identifier, on utilise différentes techniques comme l'observation des colonies, l'observation microscopique, les tests biochimiques ou encore, plus récemment, la **PCR (Polymérase Chain Reaction)**, technique moderne et complexe qui permet d'identifier les microorganismes à partir de leur ADN ; cette technique est notamment utilisée pour la détermination de la contamination par des *Brettanomyces* ;
  - de contrôler le niveau de **contamination d'une surface** et de dresser un diagnostic hygiène en cave.

### 3 ■ PRATIQUES ASEPTISÉES

La particularité des analyses microbiologiques est la nécessité absolue de travailler en totale asepsie. Ce, afin d'avoir l'assurance que les microorganismes comptabilisés ou identifiés par l'analyse

proviennent effectivement et à 100 % de l'échantillon de moût ou de vin analysé. Aussi, dans l'organisation matérielle et humaine, quasiment tout tourne autour de cet impératif d'asepsie :

- tous les contenants, matériels, supports doivent être désinfectés : les mains nettoyées avec un produit antiseptique, la paillasse (table de laboratoire) désinfectée à l'alcool à 70°, le matériel métallique passé à la flamme, la verrerie autoclavée ;
- la moindre inattention ou maladresse conduit à la contamination de l'échantillon ou des supports ou encore des réactifs par les microbes de l'air, ou des mains, ou du matériel ou encore des contenants utilisés. Ce qui fausse irrémédiablement tous les résultats de l'étude en cours. Connaissant le temps d'incubation d'une levure (2 à 5 jours), celui d'une bactérie lactique (2 semaines), on a tout intérêt à ne pas devoir recommencer les tests microbiologiques.

### 4 ■ INSTALLATIONS SPÉCIFIQUES (fiche pratique 46-1)

Le laboratoire de microbiologie doit se doter d'équipements spécifiques tels que :

- Une **hotte à flux laminaire**, pour aseptiser l'air contenu sous la hotte et un **bec Bunsen**, pour désinfecter le matériel métallique, on fait rougir le métal à la flamme ; l'ensemble permet de manipuler en asepsie, pour éviter la contamination par des germes contenus dans l'air ou sur le matériel.
- Une **étuve**, c'est-à-dire une armoire thermorégulée, permet de placer les échantillons tests à des températures qui favorisent la croissance des microorganismes étudiés ; on parle d'incubation.
- Un **autoclave** permet de désinfecter le matériel utilisé mais aussi tous les supports et les milieux de culture que l'on se destine à jeter.

### 5 ■ PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON EN CONDITION STÉRILE (fiche pratique 46-2)

L'échantillonnage destiné à une analyse microbiologique revêt une précaution supplémentaire par rapport au prélèvement destiné à un contrôle physico-chimique. Celle d'être réalisé en conditions stériles :

- **flacon** stérile, rempli sans toucher l'échantillon avec les **mains** ni un quelconque **matériel** (broc, entonnoir, pipette...) à moins d'avoir été désinfecté ; dans le cas d'une désinfection chimique, attention aux résidus de produit ;
- bouchon stérile ;
- **flambage** du col de la bouteille.  
Après le prélèvement, maintien de l'asepsie :
- interdiction stricte d'ouvrir le flacon jusqu'à l'analyse ;
- ouverture de l'échantillon seulement sous **hotte à flux laminaire** ou à proximité directe de la flamme bleue du **bec Bunsen** ;

- aucune culture microbienne, en tube ou en boîte de Pétri, ne doit être ouverte à l'air libre.
- pour les prélèvements réalisés sur une chaîne technologique, prélever au niveau de chacun des équipements de façon à diagnostiquer toute source de contamination possible : par exemple, pour une chaîne de mise en bouteille, on réalise un prélèvement d'échantillon à l'entrée puis à la sortie du filtre, à l'aval de la tireuse, puis à l'aval de la boucheuse.

En préalable des techniques de comptage ou d'identification, il faut quelquefois intervenir sur l'échantillon afin d'adapter le taux présumé de sa population microbienne :

- Si la population est très élevée, il faut **diluer** l'échantillon (**fiche pratique 46-2a**). Il s'agit alors d'une dilution similaire à celles que l'on réalise en chimie. À la différence près qu'elle s'effectue en conditions stériles : matériel et eau distillée stériles. Les échantillons qui nécessitent généralement une dilution préalable sont les moûts en cours de fermentation alcoolique ; mais aussi les levains dont on souhaite contrôler le niveau d'activité, avant incorporation dans le moût qui doit reprendre sa fermentation alcoolique. Selon les moûts, la dilution requise est une dilution au cinquième (1/5), au dixième (1/10), centième (1/100), voire au millième (1/1 000).
- Inversement, pour les milieux assez pauvres en germes, il faut **concentrer les germes par filtration** de l'échantillon (**fiche pratique 46-2b**). On procède alors à une filtration sous vide sur membrane de 0,45  $\mu$  ; cette porosité est choisie de façon à retenir tous les germes, levures ou bactéries, sur la membrane filtrante. Cette opération est en général nécessaire lors du contrôle des vins stabilisés, notamment le contrôle effectué lors du conditionnement. Dans ce cas, le contrôle microbiologique qui suit ne porte plus sur le vin lui-même, puisqu'il a été dépouillé de tous ses germes par la filtration. Mais sur la membrane de filtration qui a retenu les éventuels microorganismes à sa surface. Il faut, de ce fait, la manipuler de façon stérile : elle doit être posée et retirée avec une pince stérilisée, réaliser toutes les opérations sous hotte à flux laminaire, stériliser tout matériel au contact de la membrane.

## 6 ■ ESTIMATION DE LA VIABILITÉ D'UNE POPULATION DE LEVURES

La fermentation alcoolique nécessite un niveau de population levurienne élevé avec un taux de cellules vivantes lui-même élevé. L'affaiblissement éventuel de l'activité levurienne, au cours de la fermentation alcoolique, est mis en évidence par un ralentissement de l'évolution de la densité : la pente de la courbe tend vers l'horizontale. Pour affiner cette observation, il peut être intéressant de réaliser un comptage de la population levurienne, assorti d'une estimation de sa viabilité.

Après les fermentations, au cours des phases d'élevage et de conservation ou encore au stade de mise en bouteille, le comptage des populations permet de contrôler leur régression qui conditionne la stabilité du vin.

Différentes techniques ont cours. Trois approches différentes sont présentées ci-après.

### 6.1. Comptage sur cellule de numération au microscope (fiche pratique 46-3)

#### 6.1.1. Coloration et comptage de levures au microscope

On peut réaliser l'estimation de la viabilité d'une population de levures sur un moût en fermentation ou sur un levain de reprise de la fermentation alcoolique. Pour ce faire, on colore une prise d'échantillon, éventuellement dilué en préalable, avec du bleu de méthylène. La mise en œuvre de cette opération est détaillée dans la **fiche pratique 46-3a**.

Pour réaliser le dénombrement, on utilise un microscope optique en remplaçant la traditionnelle lame par une cellule de numération appelée également cellule de comptage. Il s'agit d'une lame quadrillée dans la masse, largement utilisée en biologie médicale (comptage des globules blancs et rouges dans le sang) et en microbiologie. Ce quadrillage facilite le comptage des cellules sous microscope. Une présentation de ce type de cellule de comptage est réalisé dans la **fiche pratique 46-3b**.

On compte les levures vivantes et les levures mortes sur une partie du quadrillage : **les levures vivantes et actives restent incolores** ; et on identifie donc comme mortes celles qui sont colorées. On peut aussi s'intéresser aux **levures en phase de bourgeonnement** : la multiplication cellulaire est le signe d'une population jeune qui se renouvelle activement. Ainsi, dans plusieurs grands carrés, (ou grands rectangles, selon la cellule de numération) on compte successivement ces trois catégories de levures.

On fait ensuite les moyennes pour un seul grand carré ou un seul grand rectangle dans les trois catégories de levures. La **fiche pratique 46-3c** expose le détail de ce dénombrement et propose une schématisation de ces « grands carrés » ou « grands rectangles ».

Par calcul, on déduit ensuite le nombre de levures vivantes, mortes et totales par millilitre d'échantillon. Il est détaillé ci-après.

#### 6.1.2. Calcul détaillé du dénombrement sur cellule de comptage (fiche pratique 46-3d)

De nombreuses cellules de numération existent, présentant chacune un quadrillage différent. Chaque cellule de numération a donc son propre mode de calcul pour parvenir au résultat de dénombrement final. Il est donc très important d'adapter le mode de calcul à la cellule de comptage ; dans le cas contraire, les résultats seront totalement erronés. Nous présentons les deux cellules de comptage les plus utilisées pour la numération des germes en œnologie : la **cellule de Thoma** et la **cellule de Malassez**. On trouvera le mode de calcul simplifié pour chacune d'elles en **fiche pratique 46-3d**. En voici, ici, le raisonnement détaillé, de façon à ce qu'il puisse être transférable à n'importe quel autre type de cellule de comptage :

• **Étape 1 : calcul du volume d'un grand carré (cellule de Thoma) ou d'un grand rectangle (cellule de Malassez), fiche pratique 46-3b**

On utilise la formule générale de calcul du volume d'un parallélogramme :

$$\text{Volume} = \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{hauteur}$$

(ici, hauteur = épaisseur entre lame et lamelle)

Exemple pour une cellule de Thoma : chaque grand carré mesure 0,2 mm de côté (longueur = largeur) ; l'épaisseur entre lame et lamelle est de 0,1 mm ; le volume d'un grand carré est donc égal à : 0,2 mm × 0,2 mm × 0,1 mm = 0,004 mm<sup>3</sup>.

Le résultat d'une numération de germes doit être donné en nombre de germes par millilitre. Le volume calculé en mm<sup>3</sup> doit donc être converti en millilitre.

Conversion d'unités : on sait que 1 dm<sup>3</sup> = 1 l ; partant de cette relation, on réalise le tableau de correspondances (tableau 46.1)

Tableau 46.1. Conversion d'unités.

dm <sup>3</sup>		cm <sup>3</sup>				mm <sup>3</sup>			
	l	dl	cl	ml					
				1	0	0	0	0	
				0,	0	0	0	1	

D'après le tableau, 1 ml = 1 000 mm<sup>3</sup> et 1 mm<sup>3</sup> = 0,001 ml. On a donc un rapport de 1/1 000 (un millième) entre le mm<sup>3</sup> et le ml.

Le volume du grand carré de la cellule de Thoma devient : 0,004 mm<sup>3</sup> = 0,004/1 000 ml = 0,000 004 ml = 4.10<sup>-6</sup> ml.

• **Étape 2 : calcul du nombre moyen de germes par grand carré ou par grand rectangle, fiche pratique 46-3d**

La numération de germes au microscope est réalisée sur un certain nombre de grands carrés du quadrillage de la cellule de Thoma ; sur le même principe, il est réalisé sur un certain nombre de grands rectangles, sur la cellule de Malassez. Cela permet d'assurer une plus grande fiabilité du résultat. Le nombre de répétitions est laissé à l'appréciation de chacun (on dira entre 3 et 5) et leur emplacement dans la cellule de comptage, choisi au hasard.

Ce qui donne par exemple sur une cellule de Thoma (n étant le nombre de germes dénombrés dans un carré) : n<sub>1</sub> sur le carré 1 ; n<sub>4</sub> sur le carré 4 ; n<sub>7</sub>, sur le carré 7 ; n<sub>10</sub> sur le carré 10 ; n<sub>15</sub> sur le carré 15. Soit 5 comptages (tableau 46.2).

Tableau 46.2. Exemple de dénombrement sur cellule de Thoma (5 comptages).

1 (n <sub>1</sub> )	2	3	4 (n <sub>4</sub> )
5	6	7 (n <sub>7</sub> )	8
9	10 (n <sub>10</sub> )	11	12
13	14	15 (n <sub>15</sub> )	16

À la fin de ce comptage, on fait donc le calcul de la **moyenne des dénombrements** (n<sub>moyen</sub>) par grand carré ou par grand

rectangle. C'est la somme des dénombrements divisée par le nombre de comptages ; pour l'exemple traité, cela donne :

$$n_{\text{moyen}} = (n_1 + n_4 + n_7 + n_{10} + n_{15}) \div 5$$

• **Étape 3 : calcul du nombre de germes par millilitre, fiche pratique 46-3d**

Pour connaître le nombre de germes par millilitre, il faut rapporter le résultat du dénombrement moyen (précédemment calculé) au volume d'un grand carré (cellule de Thoma) ou au volume d'un grand rectangle (cellule de Malassez) :

**Pour la cellule de Thoma :**

$$\text{Nbr. de germes/ml} = \frac{n_{\text{moyen}}}{\text{volume d'un grand carré de la cellule de comptage (en ml)}}$$

**Pour la cellule de Malassez :**

$$\text{Nbr. de germes/ml} = \frac{n_{\text{moyen}}}{\text{volume d'un grand rectangle de la cellule de comptage (en ml)}}$$

**Par exemple pour la cellule de Thoma :**

$$\text{Nbr. de germes/ml} = \frac{n_{\text{moyen}}}{4 \times 10^{-6}}$$

**Attention !**

Le résultat obtenu ici est celui qui concerne le moût inoculé sur la cellule de comptage. S'il y a eu dilution et/ou coloration du moût, il faut multiplier le résultat du nombre de germes/ml par le facteur de dilution calculé pour l'ensemble des dilutions occasionnées en préalable de ce comptage : la dilution éventuelle du moût lui-même et la dilution consécutive à la coloration au bleu de méthylène. La **fiche pratique 46-3d** montre que pour calculer le coefficient de plusieurs dilutions successives, il faut multiplier les coefficients de chaque dilution entre eux. **Le calcul du facteur de dilution final** suit cette même règle : il est le **produit (multiplication) des différents facteurs de dilution** entre eux.

**6.2. Comptage sur boîte de Pétri (fiche pratique 46-5)**

Cette technique permet de mettre en évidence et de quantifier l'ensemble des microorganismes : moisissures, levures de vinification, levures de contamination (*Brettanomyces*), bactéries lactiques ou bactéries acétiques. On réalise une culture sur boîte de Pétri qui permet d'évaluer les populations vivantes présentes dans les moûts et les vins ou sur les supports (équipements de cave ou emballages au moment du conditionnement). En particulier, on conseille les contrôles suivants :

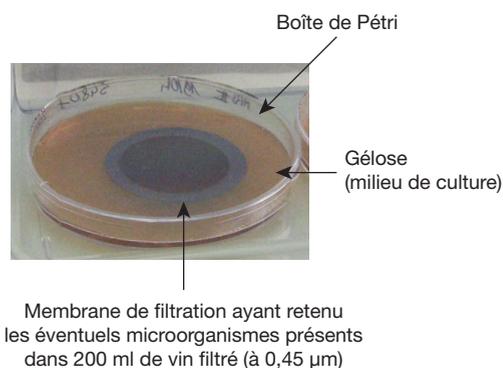
- détection précoce de la présence de *Brettanomyces* ;
- recherche spécifique de germes en cuve dans le cas d'une altération d'origine microbienne ;
- contrôle du vin durant son élevage (numération de *Brettanomyces*, levures, bactéries acétiques ou encore bactéries lactiques) et après son conditionnement (numération de levures, de bactéries) ;

– diagnostic hygiène des équipements de cave, notamment de la chaîne de mise en bouteille ; cette analyse permet de contrôler le nettoyage et la désinfection du matériel (filtre, tireuse, boucheuse, bouteille...).

Selon le taux de contamination supposé, on peut diluer ou filtrer l'échantillon avant son ensemencement (voir les **fiches pratiques 46-2a** ou **46-2b**).

L'ensemencement consiste à placer 0,1 millilitre de suspension liquide de germes par boîte de Pétri, dans le cas du vin ou du vin dilué ou la membrane de filtration, dans le cas de l'échantillon filtré (figure 46.1). Au préalable, on aura coulé dans la boîte de Pétri, un milieu de culture destiné à servir de support aux germes et à leur apporter des éléments nutritifs. Ces milieux sont liquéfiés par la chaleur ; ce chauffage permet également leur stérilisation (20 minutes à 120 °C). En refroidissant, la gélose se prend en masse ; elle se gélifie, constituant ainsi un support solide. Il existe de nombreux milieux de culture répertoriés notamment dans les normes OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin) ; par exemple :

- pour les levures : *Yeast malt agar*, composé d'extrait de levures, d'extrait de malt, de peptone, glucose, gélose et d'eau ;
- pour les bactéries lactiques : solution gélosée de jus de raisin (G.J.A.).



**Figure 46.1.** Mise en culture de la membrane de filtration sur boîte de Pétri (**fiche pratique 46-2b**).

Après l'ensemencement vient la phase d'incubation. Elle a lieu en étuve à 25-28 °C, et dure 2 à 7 jours pour les levures, 1 à 2 semaines pour les bactéries.

Le tableau 46.3 propose différents protocoles utilisés selon le microorganisme recherché.

À l'issue de cette période d'incubation, on procède à la numération : on compte toutes les colonies apparues sur la gélose. On parle d'**UFC : Unité formant Colonie** ; en effet, chaque colonie est issue de la multiplication d'un seul germe initialement présent dans la suspension introduite dans la boîte de Pétri. Donc, le nombre de colonies correspond exactement au nombre de germes présents dans le volume d'échantillon ensemencé.

En dernier lieu, on affecte le **facteur de dilution** ou le **facteur de concentration** correspondant à la préparation de l'échantillon. À l'issue de ce dernier calcul, on peut exprimer le nombre de germes par unité de volume du produit initial.

**Tableau 46.3.** Exemples de protocoles de mise en culture selon le germe recherché.

Microorganismes recherchés	Température d'incubation	Durée d'incubation	Milieu de culture
Levures	28 °C	7 jours	C.G.A.
Levures du genre <i>Brettanomyces</i>	28 °C	7 jours	Y.P.D.
Bactéries acétiques	26 °C	7 jours	Carr Agar
Bactéries lactiques	28 °C 28 °C	7 jours 14 jours	G.J.A. M.R.S.

(Source : Laboratoire de microbiologie d'Inter Rhône. Le contrôle microbiologique. Fiche téléchargeable sur le site [ltvinsrhone.actu.com](http://ltvinsrhone.actu.com).)

### 6.3. Comptage par épifluorescence

Bien que la méthode sur boîte de Pétri reste la référence, la méthode par épifluorescence est une technique récente qui présente l'avantage d'un diagnostic rapide : dans la journée-même, contre 7 jours au minimum pour la méthode sur boîte de Pétri.

Cette technique est notamment conseillée pour le diagnostic des fermentations languissantes ou arrêts lors de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malolactique, les contrôles avant chaque filtration et avant le conditionnement du vin.

L'échantillon de vin, prélevé en conditions stériles est filtré sur membrane. La membrane filtrante est mise en contact avec un fluorochrome, molécule ayant des propriétés fluorescentes. Au contact du fluorochrome, seuls les microorganismes vivants sont capables de devenir fluorescents, tandis que les microorganismes morts n'émettent aucune fluorescence. Avec un microscope adapté, on peut ainsi dénombrer les levures ou les bactéries vivantes rendues fluorescentes. Le seuil de détection est relativement bas : 10 à 100 germes par millilitre (figure 46.2).



**Figure 46.2.** Photographies de germes en épifluorescence.

G : Grossissement

(Source : Laurent Massini, laboratoire de microbiologie d'Inter Rhône.)

### 6.4. Interprétation du dénombrement d'une population de levures (fiche pratique 46-4)

L'interprétation des résultats doit tenir compte du stade auquel est réalisé le contrôle microbien : au cours de la phase fermentaire, au cours de l'élevage et de la conservation du vin ou lors de son conditionnement.

#### 6.4.1. Estimation de la viabilité d'une population de levures pendant la fermentation alcoolique

La cinétique de la fermentation alcoolique est directement liée à la population levurienne implantée dans le moût. Ainsi, le bon déroulement de la fermentation alcoolique est conditionné par une population levurienne élevée, dépassant plusieurs dizaines de millions de levures par millilitres de moût ( $90.10^6$  cellules/ml). Cela, dès le 2<sup>e</sup> jour qui suit son enclenchement. On reconnaît également une fermentation alcoolique active au taux de viabilité des levures (proche de 85-90 %). Inversement, lorsque le nombre de levures diminue (par exemple autour ou en dessous de  $35.10^6$  cellules/ml) et que le taux de mortalité s'élève, l'activité levurienne ralentit, voire s'arrête.

#### 6.4.2. Estimation de la population dans un vin en phase de conservation ou de conditionnement

Après la phase fermentaire, les populations doivent régresser notamment grâce à certains traitements (sulfitage, collage, soutirage, filtration...) et le raisonnement à tenir dépend de plusieurs facteurs :

- **Le taux de sucres résiduels** : un vin dans lequel subsistent des sucres résiduels est plus instable qu'un vin sec. Le seuil de tolérance en matière de microorganismes est dans ce cas plus sévère.
- **Le circuit de distribution** : deux angles de perspective sont à étudier :
  - les vins de circuit court, dont la mise en marché a lieu dans les mois qui suivent leur vinification jusqu'à 18-24 mois au plus tard sont consommés jeunes. Les vins de circuit long, de moyenne ou longue garde voient leur mise en marché à partir de 18 mois qui suivent leur récolte. Du reste, ils sont consommés quelquefois plusieurs années après leur commercialisation. Ainsi, le **risque** que l'on prend à laisser persister une flore microbienne dans les vins **s'élève avec la durée de garde du vin** ;
  - vente directe, grande distribution, marché national ou export... Selon le circuit de distribution, le vin est soumis à des **conditions de stockage et de transport** différents qui peuvent influencer sur le développement d'une population microbienne latente ; on veillera donc à mesurer le risque afin d'adapter le degré de précaution spécifique à chaque cas ;
  - au-delà de ces considérations techniques, il faut savoir que le degré d'exigence en matière de population microbienne dans le vin embouteillé peut faire l'objet de limites imposées par un **cahier des charges** ou une **norme de qualité** que l'on se fixe soi-même ou qui sont imposés par un marché ; cela est notamment le cas pour les marchés en grande distribution ou à l'export. Il est alors impératif de s'informer sur les exigences spécifiques éventuelles et de contrôler que le vin est bien conforme à ces exigences.

Notons que dans la mesure où les microorganismes du vin ne présentent aucun risque pour la santé humaine, la réglementation n'impose pas de limitation.

## 7 ■ DIAGNOSTIC HYGIÈNE PAR ATP-MÉTRIE (fiches pratiques 46-6 à 46-8)

Cette technique permet le contrôle microbiologique de toutes les surfaces au contact du vin. Elle présente deux gros avantages : le premier est de conduire à un résultat instantané. Le second réside dans la simplicité de mise en œuvre de la mesure. On fait appel à cette technique, notamment dans les cas suivants :

- Contrôle d'hygiène des **équipements de cave**, notamment de la chaîne de conditionnement (mise en bouteille, mise en BIB®). On s'intéresse à chaque élément qui compose le circuit suivi par le vin : cuve de stockage, vanne, robinet de dégustation, joint et raccord de tuyauterie, pompe (entrée et sortie) et chaque matériel assurant l'opération contrôlée ; par exemple, pour le conditionnement : filtre, rinceuse, tireuse, boucheuse... Ce diagnostic hygiène est également intéressant à chaque étape de la récolte, de la vinification, de l'élevage et du stockage du vin.
- Contrôle de l'eau utilisée dans le chai pour les opérations de nettoyage, notamment contrôle de l'**eau du dernier rinçage**, très bon indicateur de la procédure de nettoyage mise en œuvre.
- Contrôle des **matières sèches** lors du conditionnement du vin : bouteilles, bouchon...

Cette technique utilise l'adénosine triphosphate (ATP), molécule présente dans toutes les cellules vivantes, notamment les cellules microbiennes. L'ATP est la forme universelle de stockage et de transfert de l'énergie dans la cellule. Elle conditionne donc toutes les activités vitales des organismes vivants. À la mort de la cellule, cette molécule est rapidement dégradée. **L'ATP est donc un excellent marqueur de la présence d'un microorganisme vivant.**

Pour doser la molécule d'ATP, on la fait intervenir dans une réaction bioluminescente, comme celle qui fait scintiller le ver luisant. Cette réaction biochimique met en œuvre un pigment, la luciférine et une enzyme spécifique à la réaction, la luciférase. Lorsqu'on injecte de l'ATP dans un mélange luciférine-luciférase- $Mg^{2+}$ , il se produit une émission lumineuse ; elle est maximale au bout de quelques secondes et s'annule au bout d'une minute environ. L'intérêt de ce procédé est que la mesure de l'intensité lumineuse est proportionnelle à la quantité d'ATP mise en jeu dans la réaction.

Ainsi, lors du contrôle du taux de contamination microbienne d'une surface, c'est l'ATP des cellules vivantes qui déclenche la réaction de bioluminescence. Et cela, proportionnellement au nombre de germes présents sur la surface. Ces germes sont collectés par écouvillonnage de la surface selon un protocole bien précis (**fiche pratique 46-7**).

La mise en œuvre pratique de l'échantillonnage et de la mesure sont réalisées comme suit : on sort d'un tube stérile un écouvillon (sorte de coton-tige). On passe l'écouvillon sur toute la surface que l'on souhaite tester dans le but de collecter la totalité des microbes présents. L'écouvillon est ensuite replacé dans son tube dont le fond contient le réactif (complexe luciférine-luciférase) dans des conditions qui favorisent la réaction (pH = 6,8, température optimale = 21 °C). Les cellules microbiennes vivantes présentes sur l'écouvillon meurent rapidement, sont

lysées (détruites) par leurs propres enzymes et libèrent ainsi l'ATP qu'elles contiennent. Cela déclenche la réaction lumineuse. Le tube contenant l'écouvillon et le réactif est placé dans l'appareil appelé ATP-mètre qui est réglé sur la longueur d'onde de 562 nm afin d'y mesurer l'intensité lumineuse. L'ATP-mètre est présenté dans la **fiche pratique 46-6**. La lumière mesurée est exprimée en RLU (unité relative de luminescence). Les fourchettes de valeurs listées dans la **fiche pratique 46-8** permettent de réaliser le diagnostic hygiène de la surface testée.

## 8 ■ DIAGNOSTIC DE LA PRÉSENCE DE *BRETTANOMYCES* DANS LES VINS PAR PCR

Cette levure de contamination du vin a la particularité de diminuer le caractère fruité des vins au profit du **caractère phénolé** qui se caractérise par des odeurs de sueur de cheval, d'écurie ou de

gouache et d'encre. Cela, par la production de composés appelés phénols volatils (éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaiacol).

La PCR, polymérase chain reaction, est utilisée en criminologie pour réaliser des empreintes génétiques. En œnologie, elle permet de reconnaître l'ADN des levures du genre *Brettanomyces*. Cette méthode, présente l'avantage d'obtenir en 24-48 heures le résultat, alors qu'il faut attendre 7 jours pour la méthode de mise en culture sur boîte de Pétri.

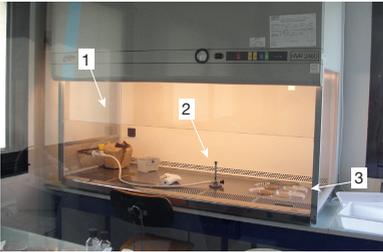
La numération des *Brettanomyces* par PCR peut s'avérer utile tout au long du processus d'élaboration, en particulier :

- en phase de latence de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique ;
- en contrôle d'implantation lors des deux fermentations ;
- avant filtration finale du vin.

La qualité de l'échantillonnage est déterminante pour le résultat : pour les vins en cuve, il est important de prélever en bas de cuve (les *Brettanomyces* y sont majoritaires), dans des conditions aseptiques déjà évoquées, dans un flacon stérile (250 ml). Pour les vins embouteillés, l'analyse est réalisée à partir d'une bouteille du lot suspecté.

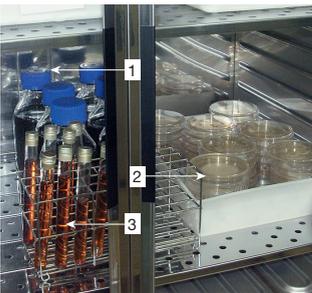
## FICHE PRATIQUE 46-1 Microbiologie

## Particularités du laboratoire de microbiologie



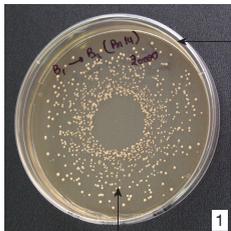
Hotte à flux laminaire qui génère un air purifié en particules avec bec Bunsen, pour manipulation sous ambiance stérile.

Seul l'air de l'enceinte de la hotte est stérile ; la vitre (1) doit rester à demi-baissée pour éviter la contamination extérieure. La flamme du bec Bunsen (2) permet de stériliser le matériel métallique qui permet de prélever du vin pour ensemercer les géloses (milieux nutritifs) ici coulés en boîte de Pétri (3).



Étuve (ici programmée à 28 °C) pour la mise en culture (incubation) selon différentes modalités.

Vin pur, en flacon rempli au tiers : test de tenue à l'air pour juger de la stabilité microbienne (1) ; cultures sur gélose coulée en boîte de Pétri pour comptage de colonies (2) ; cultures sur gélose coulée en tube, bouché à la ouate (3) pour étude d'identification de germes (microorganismes).



Boîte de Pétri

Colonies



Exemples de résultats de mise en culture, sur gélose coulée en boîte de Pétri, après séjour en étuve.

**Culture pure** de *Brettanomyces* (1) : la culture est homogène, les colonies sont identiques. Note : chaque colonie provient au départ d'un seul germe (d'une seule cellule).

**Diagnostic d'hygiène** (2) : la culture est hétérogène, les colonies sont d'aspect différent les unes aux autres. Chaque colonie peut ensuite être étudiée **morphologiquement** à l'œil nu, puis au microscope, puis subir des tests biochimiques. L'ensemble des résultats donne une **clé d'identification** qui permet de retrouver le *genre* et l'*espèce* du germe. Pour les bactéries, la **coloration de Gram** permet de distinguer les bactéries lactiques (Gram-positif) des bactéries acétiques (Gram-négatif).



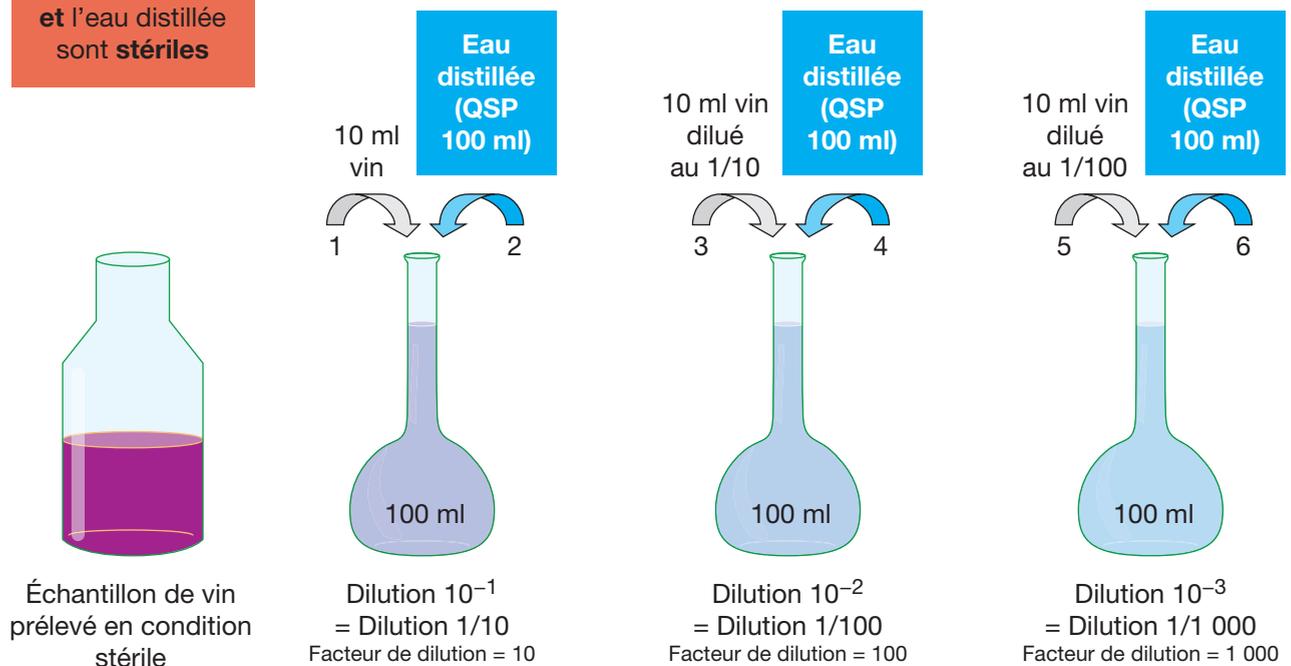
Autoclave permettant d'assurer la stérilisation du matériel ou des milieux de culture.

Vue intérieure de l'autoclave (1) ; désinfection de boîtes de Pétri et de leur milieu de culture (2), après identification ou comptage des colonies s'y étant développées. Elles pourront être jetées après stérilisation.

**FICHE PRATIQUE 46-2a**  
 Microbiologie

**Dilution d'un échantillon avant un contrôle microbiologique**
**Cas d'une population microbienne élevée**
**Attention :**

Tout le matériel  
et l'eau distillée  
sont **stériles**


**Conseils pratiques :**

- Réaliser les **dilutions en série** (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-3</sup>) car on ne peut pas précisément prévoir la dilution qui sera la plus adaptée\*.
- Utiliser une **pipette jaugée à 2 traits** et changer de pipette à chaque dilution (si elle n'est pas suffisamment rincée, la dilution sera faussée).
- « **Eau distillée QSP 100 ml** » signifie qu'il faut compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée stérile (ceci, après avoir introduit les 10 ml de la solution à diluer).
- Bien **homogénéiser** avant de prélever les 10 ml de vin ou de la dilution précédente (retourner la fiole jaugée plusieurs fois, bouchon vers le sol, tenu avec le pouce) ; ne pas faire mousser.
- Le **facteur de dilution (FD)** multiplie le résultat de la population trouvée dans 1 ml d'échantillon dilué de façon à l'exprimer pour 1 ml de l'échantillon de départ (non dilué).  
Voir les calculs en [fiche pratique 46-3d](#).

\*Remarque : on peut avoir besoin d'autres dilutions. D'autres exemples sont donnés dans les fiches pratiques qui suivent, notamment dans les [fiches pratiques 46-3a et 46-3d](#).

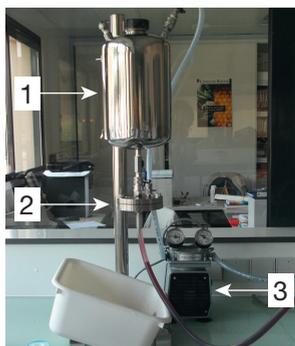
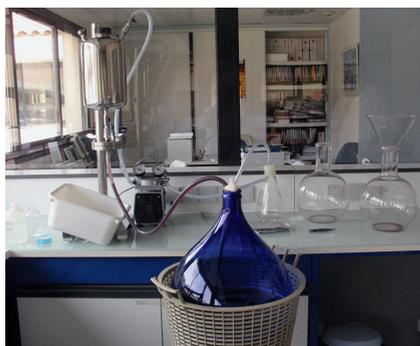
**Exemple :**

Si l'on trouve 90.10<sup>4</sup> levures/ml de moût dilué à 10<sup>-3</sup> (dilution à 10<sup>-3</sup> = dilution au 1/1 000, facteur de dilution = 1 000) ; alors, le résultat final est 90.10<sup>4</sup> × 1 000 = 90.10<sup>4</sup>.10<sup>3</sup> = 90.10<sup>4+3</sup> = 90.10<sup>7</sup>.  
Soit 90.10<sup>7</sup> levures/ml dans le moût prélevé.

## FICHE PRATIQUE 46-2b Microbiologie

### Filtration d'un échantillon sur membrane stérilisante

#### Cas d'une population microbienne très faible



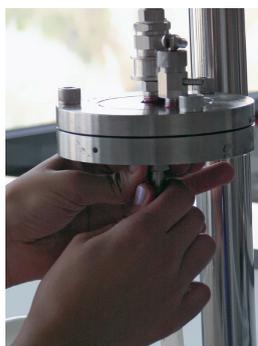
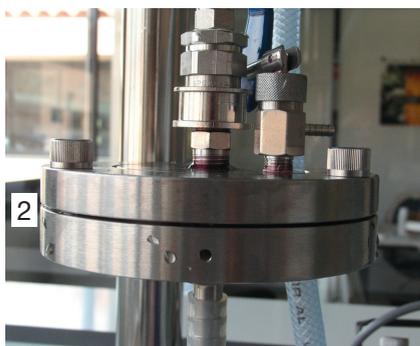
**Filtre de laboratoire :** carter (1) ; support de la membrane filtrante (diamètre très large) (2) ; pompe à vide (3).

**Filtration** sous vide sur membrane stérilisante (0,45 µm).

**Cas du diagnostic d'hygiène :** estimation des populations microbiennes dans les vins, par exemple lors de la mise en bouteille : filtration de 200 ml de vin.

**Autre cas :** stérilisation d'un lot de vins (ici en bonbonne) dans le cadre expérimental.

**Manipulation du filtre :** voir [fiche pratique 48-1](#).



**Fin de la filtration :** démontage du support de la membrane filtrante et récupération de la membrane porteuse des microorganismes déposés tout au long de la filtration.

Manipulation de la membrane de filtration à la pince (stérile) sous la hotte à flux laminaire (ambiance stérile).

**L'après filtration :** mise en culture des germes retenus sur la membrane filtrante.



La membrane est déposée sur un milieu de culture (choisi en fonction de la recherche souhaitée) pour permettre aux quelques germes retenus de se multiplier (en étuve). Cette multiplication cellulaire donne lieu à la formation de petits amas appelés colonies : chaque cellule (invisible à l'œil nu) forme une seule colonie (visible à l'œil nu). Ci-contre, recherche de bactéries : la culture en jarre permet d'assurer un milieu en anaérobiose pour favoriser la croissance des bactéries.

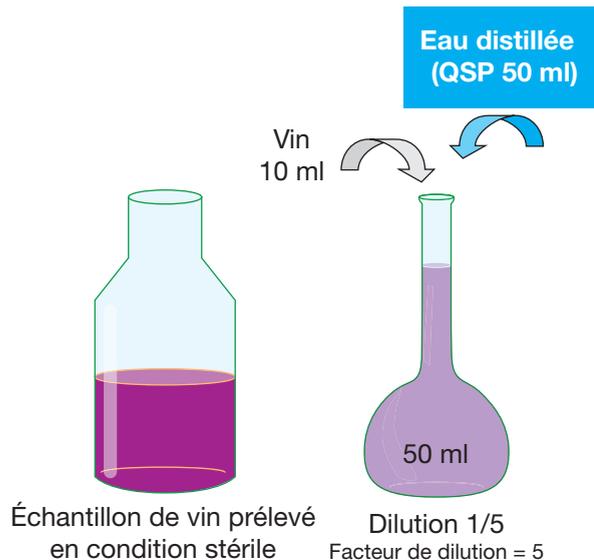
→ Voir un résultat de colonies de levures du genre *Brettanomyces* cultivées en boîte de Pétri ([fiche pratique 46-1](#)).

## FICHE PRATIQUE 46-3a Microbiologie

## Préparation d'une cellule de numération

### Étape 1 : dilution au 1/5

- Pipeter (avec une pipette jaugée à 1 ou 2 traits) stérile, 10 ml du moût à contrôler, prélevé dans les conditions stériles.
- Verser dans une fiole jaugée de 50 ml (stérile).
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée stérile.



**Conseils, précautions ou autre dilution :**  
voir [fiche pratique 46-2a](#).

### Préparation et conservation du colorant (bleu de méthylène) :

- Préparer 1 litre de tampon sodium tricitrate à 2 % poids/volume.
- Ajouter 100 mg de bleu de méthylène.
- Filtrer.
- Conserver à l'obscurité.

### Étape 2 : coloration au bleu de méthylène

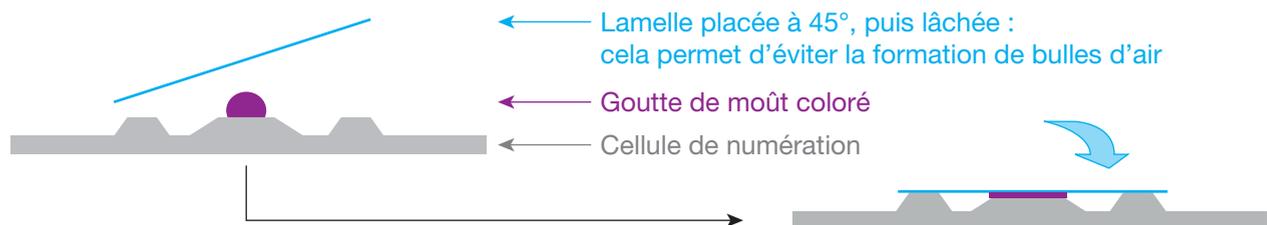
- Verser 1 ml de moût mesuré avec une pipette jaugée stérile dans un petit becher.
- Ajouter 1 ml de bleu de méthylène mesuré avec une 2<sup>e</sup> pipette jaugée stérile.
- Homogénéiser et attendre 10 minutes.

### Remarques :

- Veiller à ajouter le colorant « volume à volume » c'est-à-dire selon un volume rigoureusement identique à celui du moût (= dilution au 1/2).
- Une seule goutte de moût coloré est nécessaire sur la cellule de comptage.

### Étape 3 : préparation de la cellule de comptage

- Déposer une goutte de moût coloré (prélevé avec une pipette stérile) au centre de la cellule de comptage (au niveau du quadrillage).
- Recouvrir d'une lamelle.
- Placer sur le microscope et observer au grossissement  $\times 100$ .
- Effectuer la numération selon le protocole propre à la cellule utilisée et selon les conseils de la [fiche pratique 46-3c](#).



## FICHE PRATIQUE 46-3b Microbiologie

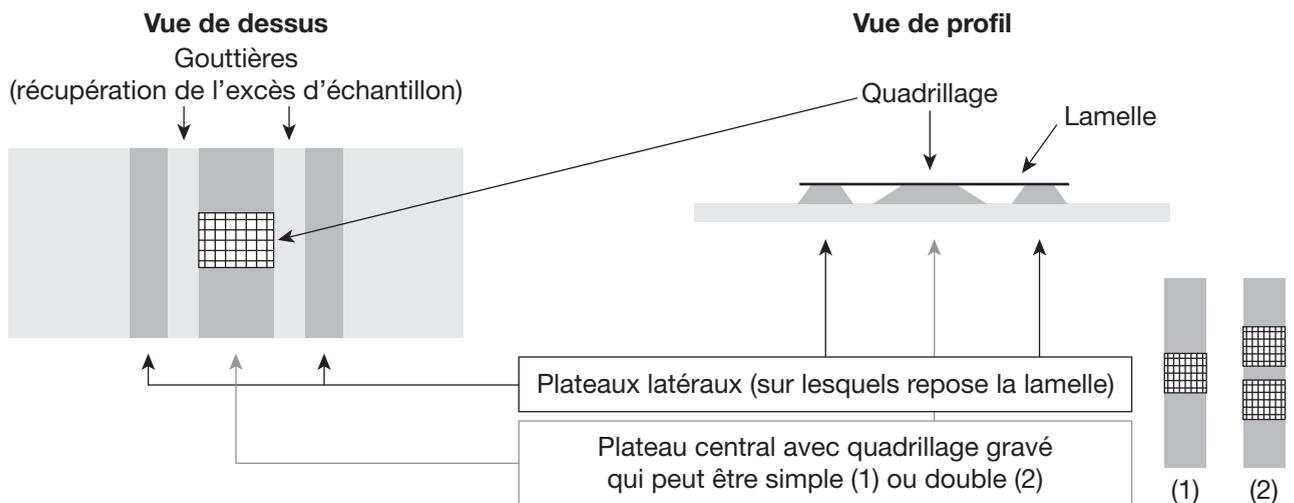
## Caractéristiques techniques d'une cellule de numération



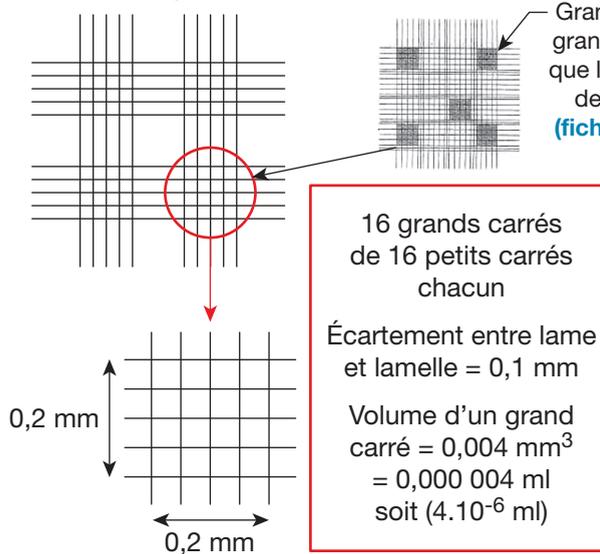
La cellule de numération est une lame de microscope portant un quadrillage gravé qui facilite le comptage des cellules observées au microscope. Les plus utilisées pour la numération des micro-organismes sont la cellule de Malassez et la cellule de Thoma.

### Précaution :

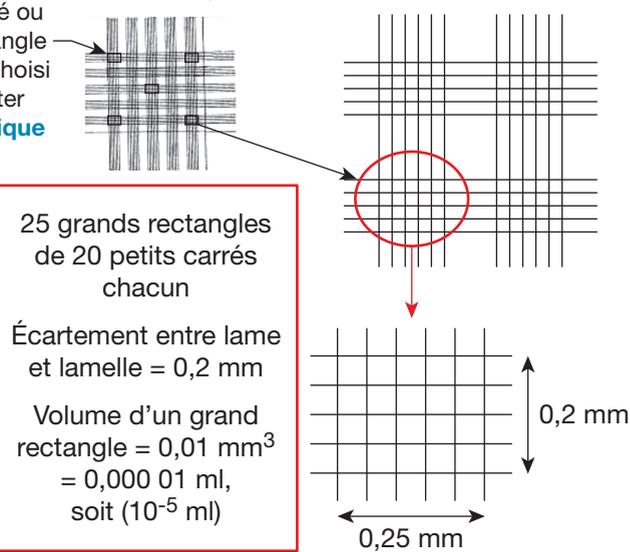
D'un modèle de cellule à l'autre, bien que d'aspect extérieur similaire, le quadrillage diffère : il faut donc veiller à utiliser le mode opératoire et le mode de calcul qui se rapportent précisément au modèle de cellule utilisé.



### Quadrillage de la cellule de Thoma :

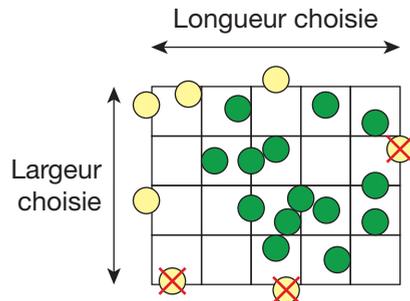


### Quadrillage de la cellule de Malassez :



## FIGHE PRATIQUE 46-3c Microbiologie

## Technique de comptage sur une cellule de numération

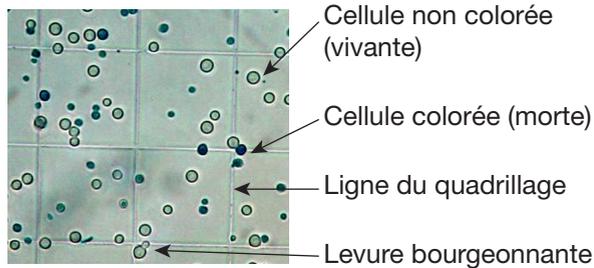


Schématisation des cellules de levures ou de bactéries sur un quadrillage de cellule de numération (exemple de la cellule de Malassez)

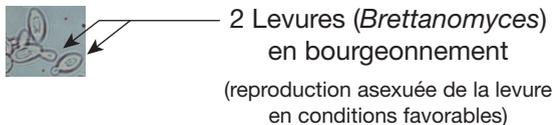
Les cellules à dénombrer :

- Toutes les cellules à l'intérieur du grand rectangle : 14 ●
  - Pour les cellules positionnées sur la limite du grand rectangle, on comptabilise les cellules d'une seule longueur et d'une seule largeur (soit 2 côtés sur 4) : 4 ●
- Soit au total pour le grand rectangle : 18 cellules.

Différenciation des levures vivantes et des levures mortes par coloration au bleu de méthylène



Comptage sous microscope (grossissement  $\times 400$ )

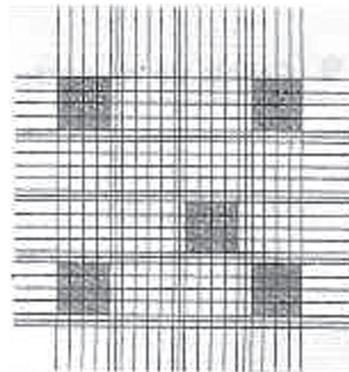


### Remarques :

- Les cellules qui semblent être plus petites sont en fait de la même taille : elles sont simplement dans un plan un peu plus reculé : en faisant avancer l'objectif du microscope très légèrement avec la vis micrométrique elles apparaissent du même format que les autres et leur coloration est plus distincte.
- Au final, tout doit être comptabilisé : « petites » ou « grosses », colorées ou non : la somme cellules vivantes + cellules mortes donne la population totale.
- On peut aussi distinguer les levures en bourgeonnement car elles attestent d'une activité intense (jeunesse, croissance active de la population, présence de nutriments).

Détermination du nombre de grands carrés ou de grands rectangles à dénombrer

- Dénumbrer le nombre de cellules dans plusieurs grands carrés (cellule de Thoma) ou de plusieurs grands rectangles (cellule de Malassez). On en choisit en général 3 à 5. Ci-contre, on a choisi de dénumbrer 5 grands carrés (ils apparaissent grisés).
- Calculer le nombre de cellules par ml d'après la [fiche pratique 46-3d](#).



Comptage de 5 grands carrés (sur 16) dans la cellule de Thoma

**FICHE PRATIQUE 46-3d**  
*Microbiologie*
**Calculs sur une cellule de numération**
**Étape 1 : calcul du nombre de germes moyen par grand carré (cellule de Thoma) ou grand rectangle (cellule de Malassez)**

- Reprendre les résultats de chaque dénombrement réalisé selon la **fiche pratique 46-3c** (entre 3 et 5 comptages).
- Réaliser la moyenne ( $n_{\text{moyen}}$ ) du nombre de germes par grand carré (cellule de Thoma) ou par grand rectangle (cellule de Malassez) :

$$n_{\text{moyen}} = \text{Somme des résultats de chaque comptage} / \text{Nombre de résultats}$$

**Étape 2 : calcul du nombre de germes par millilitre**

- Diviser le nombre de germes moyen ( $n_{\text{moyen}}$ ) par le volume du grand carré ou du grand rectangle calculé dans la **fiche pratique 46-3b** :

$$\text{Nombre de germes/ml d'échantillon dilué} = \frac{n_{\text{moyen}}}{\text{volume du grand carré en ml}}$$

- Ne pas oublier de multiplier le résultat précédent par le facteur de dilution (FD) : il est donné en **fiche pratique 46-2a et 46-3a**.

$$\begin{aligned} \text{Pour la cellule de Thoma* : germes/ml} &= \frac{n_{\text{moyen}}}{4 \times 10^{-6}} \times \text{FD} \\ &= \frac{n_{\text{moyen}} \times 10^6}{4} \times 5 \\ &= n_{\text{moyen}} \times 10^6 \times 5/4 \\ &= n_{\text{moyen}} \times 10^6 \times 1,25 \\ &= 125 \times 10^4 \times n_{\text{moyen}} \quad \text{germes/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pour la cellule de Malassez* : germes/ml} &= \frac{n_{\text{moyen}}}{10^{-5}} \times \text{FD} \\ &= n_{\text{moyen}} \times 10^5 \times 5 \\ &= 5 \times 10^5 \times n_{\text{moyen}} \quad \text{germes/ml} \end{aligned}$$

\* Dans le cas d'une dilution de l'échantillon au 1/5, FD = 5.

**Précaution :**

Si la préparation dénombrée a été colorée au bleu de méthylène, ne pas oublier de tenir compte de la dilution engendrée par la coloration :

Coloration = Dilution au 1/2, soit FD = 2 (**fiches pratiques 46-2a et 46-3a**).

**Exemple :**

Un moût dilué au 1/5 puis coloré au bleu de méthylène est donc dilué au 1/10 ( $1/5 \times 1/2$ ) ; le facteur de dilution à appliquer est alors égal à 10.

**FICHE PRATIQUE 46-3e**  
*Microbiologie*
**Tableau de collecte des résultats**
**Comptage et calculs**

Comptage grand carré (Thoma) ou grand rectangle (Malassez)	Levures mortes	Levures vivantes	Levures bourgeonnantes	Levures totales (mortes + vivantes)
carré/rectangle 1				
carré/rectangle 2				
carré/rectangle 3				
carré/rectangle 4				
carré/rectangle 5				
Moyenne (total de la colonne/5)				
<b>Nombre de levures par ml</b> formule de calcul : <b>fiche pratique 46-3d</b> (levures.ml <sup>-1</sup> )				
<b>Taux de viabilité (%) = % levures vivantes :</b> (levures totales – levures mortes) ÷ levures totales × 100				

**FICHE PRATIQUE 46-4**  
*Microbiologie*
**Interprétation du nombre de germes**
**Évolution de la population microbienne au cours de la vinification (ordres de grandeur)**

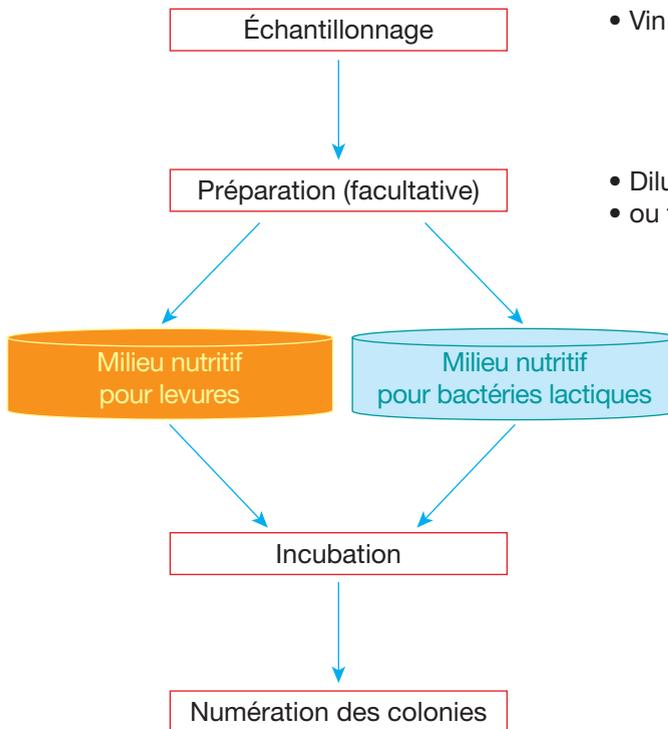
10 000 à 100 000 germes vivants par ml	Moût frais, débourbé sans excès
90 millions de germes vivants par ml (premiers jours de la fermentation alcoolique)	Croissance rapide de la population levurienne favorisant l'enclenchement de la fermentation alcoolique
1 à 10 millions (ou plus) de germes vivants par ml et taux de viabilité de 85 à 90 %	Moût en cours de fermentation alcoolique (fermentation active)
Moins de 10 millions de germes vivants par ml et taux de viabilité inférieur à 50 %	Ralentissement de la fermentation alcoolique (risque de problème fermentaire)
10 000 à 100 000 germes vivants par ml	Vin nouveau après une filtration de dégrossissage
Maximum 1 000 germes vivants par ml	Vin prêt pour son conditionnement (avant filtration fine)

**Normes usuelles de stabilité biologique pour un vin embouteillé**

CAS GÉNÉRAL : VINS SECS (sucres résiduels < 2 g.l <sup>-1</sup> )	
Moins de 0,1 microorganisme vivant par ml (Soit 75 germes par bouteille)	Norme <b>très stricte</b> , parfois exigée pour le marché à l'exportation
Moins de 2 microorganismes vivants par ml	Vin dit « pauvre en germes ». <b>Bonne</b> mise en bouteille pour le marché intérieur et pour l'exportation
2 à 100 microorganismes vivants par ml	Vin limpide et brillant. <b>Acceptable</b> dans le cadre d'un circuit de commercialisation court (vin consommé moins de 18 mois après sa récolte)
100 à 10 000 microorganismes vivants par ml	Vin limpide à brillant mais instable. <b>Risque élevé</b> d'altération microbienne
100 000 microorganismes vivants par ml	Vin présentant un trouble ou un dépôt microbien : <b>inacceptable</b> au conditionnement
CAS PARTICULIER DES VINS CONTENANT DES SUCRES RÉSIDUELS	
Moins de 5 microorganismes par bouteille et aucune levure (vin sucré)	Vin dit « stérile » : qualité <b>indispensable</b> pour une commercialisation en circuit long
0,1 à 1 microorganisme vivant par ml (vin sucré)	<b>Stabilité réduite</b> dans le temps (1 à 2 mois) ne convenant que pour une commercialisation en circuit court

FICHE PRATIQUE 46-5  
Microbiologie

## Ensemencement et comptage sur boîte de Pétri



- Vin : Prélèvement stérile

- Dilution : [fiche pratique 46-2a](#)
- ou filtration : [fiche pratique 46-2b](#)

- Choix du milieu nutritif en fonction de la population suspectée (normes OIV)

- Étuve à 25-28 °C
- Levures : 2 à 7 jours
- Bactéries lactiques : 1 à 2 semaines



### Compteur sensitif de colonies :

Affichage digital du nombre de colonies ; il s'incrémente chaque fois que l'on touche le couvercle de la boîte de Pétri avec la pointe du feutre pour marquer une colonie

Cadran noir, ou lumineux, quadrillé : on y dépose la boîte de Pétri ; il reste visible par transparence

Loupe

### Boîte de Pétri en fin de comptage sur le cadran du compteur de colonies :

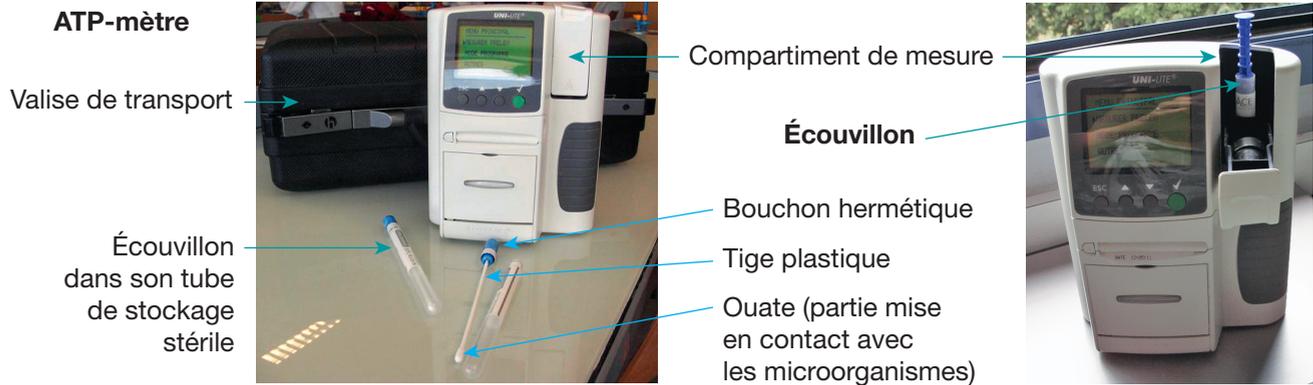
Chaque colonie comptée a été pointée au feutre noir (ce qui incrémente le compteur, qui envoie aussi un signal sonore). Ici, peu de germes : 11 UFC (unité formant colonie).

Le compteur de colonies est très appréciable pour les fortes populations microbiennes, telle ci-contre, à droite :



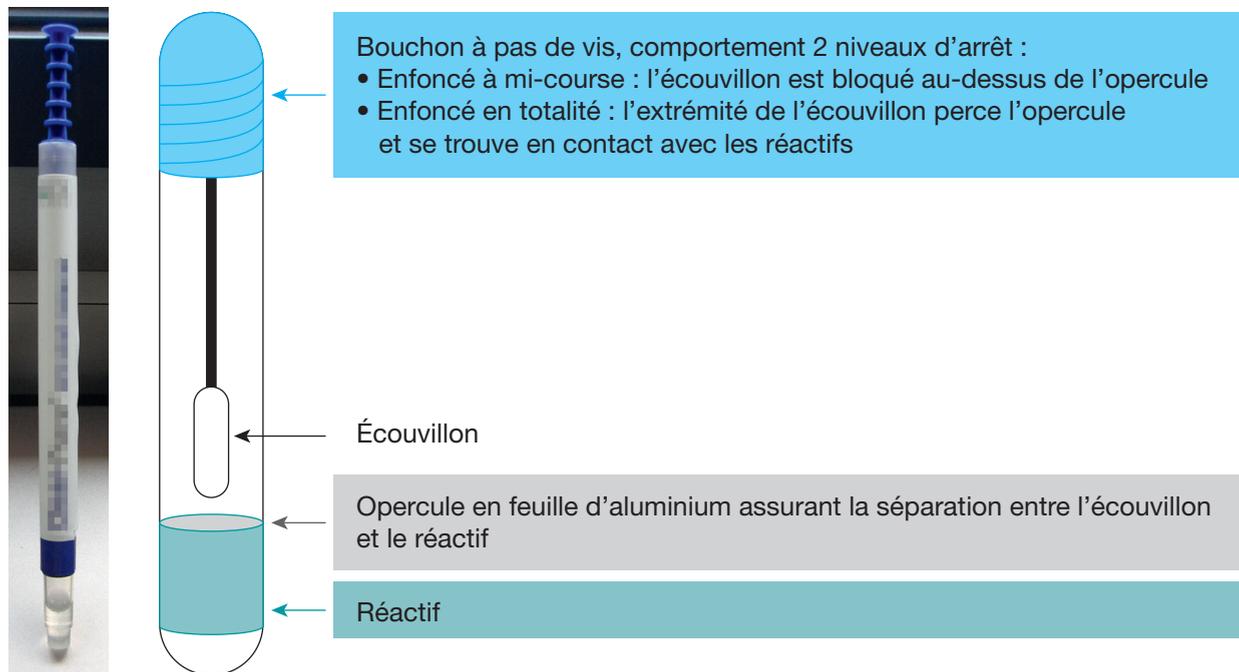
## FICHE PRATIQUE 46-6 Microbiologie

## ATP-métrie Appareil et fournitures



### Précautions :

- À la mise en route de l'appareil, s'assurer que les batteries sont chargées.
- L'écouvillon doit être conservé au réfrigérateur (entre 3 et 8 °C) et porte une date de péremption.
- L'écouvillon n'est sorti de son tube qu'au moment du prélèvement.
- L'extrémité de l'écouvillon, recouverte de ouate, ne doit pas être touchée avec les doigts, ni ne toucher autre chose que la surface à prélever.
- Sitôt le prélèvement terminé, l'écouvillon est réinséré dans son tube (qui contient les réactifs).



## FICHE PRATIQUE 46-7

### Microbiologie

## ATP-métrie

### Mode opératoire

#### Étape 1 : Prélèvement de surface

- Repérer la surface à tester : elle doit être de 100 cm<sup>2</sup> environ (soit 10 cm × 10 cm).
- À proximité directe de cette surface à tester, dévisser complètement un écouvillon neuf pour le retirer de son tube (attention de ne pas perforer l'opercule en tournant dans le mauvais sens).
- Passer l'écouvillon sur la surface à tester en appuyant légèrement et en croisant afin de réaliser des passages resserrés conformément au schéma ci-contre.
- Introduire l'écouvillon dans son tube en vissant à mi-course de façon à ne pas perforer l'opercule ([fiche pratique 46-6](#)).
- Noter la référence de l'échantillon sur le tube ; l'analyse peut être différée de quelques heures, si nécessaire, à la condition de ne pas percer l'opercule.

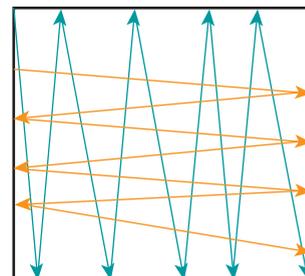


Schéma de la méthode d'écouvillonnage

#### Étape 2 : Mesure du blanc (sur un écouvillon non usagé)

- Cette étape doit être réalisée en début de chaque série de mesures.
- Visser complètement un écouvillon neuf dans son tube afin de percer l'opercule et de plonger la ouate dans le réactif (un schéma légendé de l'écouvillon est donné dans la [fiche pratique 46-6](#)).
- Agiter le tube de haut en bas pendant 10 secondes pour homogénéiser le réactif et imprégner la ouate.
- Insérer le tube dans le compartiment de mesure de l'ATP-mètre et refermer le compartiment de l'appareil.
- Sélectionner la fonction « mesure » (se référer si nécessaire à la notice de l'appareil)
- Lire quatre mesures consécutives (en sélectionnant chaque fois la fonction « mesure » et sans toucher au tube contenant l'écouvillon).
- Noter les résultats dans le tableau de traitement des mesures donné dans la [fiche pratique 46-8](#).



#### Étape 3 : Mesure de l'échantillon prélevé (sur un écouvillon utilisé)

- Pour provoquer la réaction (et permettre la mesure), visser complètement l'écouvillon dans son tube afin de percer l'opercule et de plonger la ouate dans le réactif.
  - Agiter le tube de haut en bas pendant 10 secondes pour homogénéiser le réactif et le mettre en contact avec les microorganismes retenus sur la ouate.
  - Insérer le tube dans le compartiment de mesure de l'ATP-mètre et refermer le compartiment
  - Sélectionner la fonction « mesure » (se référer si nécessaire à la notice de l'appareil).
  - Lire plusieurs mesures consécutives en sélectionnant chaque fois la fonction « mesure » et sans toucher au tube contenant l'écouvillon ; les valeurs augmentent progressivement.
  - Noter les résultats dans le tableau de traitement des mesures donné dans la [fiche pratique 46-8](#).
  - Cesser de noter les valeurs des mesures lorsque la valeur affichée diminue.
- Pour le traitement et l'interprétation des valeurs mesurées, se reporter à la [fiche pratique 46-8](#).



**FICHE PRATIQUE 46-8**  
*Microbiologie*
**Traitement des résultats et diagnostic hygiène**
**Étape 1 : traitement des résultats de mesure par ATP-métrie**

	Répétition des mesures (RLU)	Mesure sélectionnée pour le calcul du résultat (RLU)
<b>Écouvillon stérile et réactif</b> = <b>Blanc</b>	Lecture 1 = Lecture 2 = Lecture 3 = Lecture 4 =	Lecture moyenne Blanc**
<b>Échantillon prélevé sur la surface à tester</b>	Lecture 1' = Lecture 2' = Lecture 3' = Lecture 4' = etc*...	Lecture maximale Échantillon***

\*Cesser le relevé des résultats lorsque la valeur lue diminue.

\*\* Lecture moyenne Blanc = (lecture 1 + lecture 2 + lecture 3 + lecture 4) ÷ 4.

\*\*\* Lecture maximale Échantillon = la plus élevée des valeurs lues sur l'échantillon.

RLU (unité relative de luminescence).

**RÉSULTAT** (en RLU) = lecture maximale Échantillon – lecture moyenne Blanc

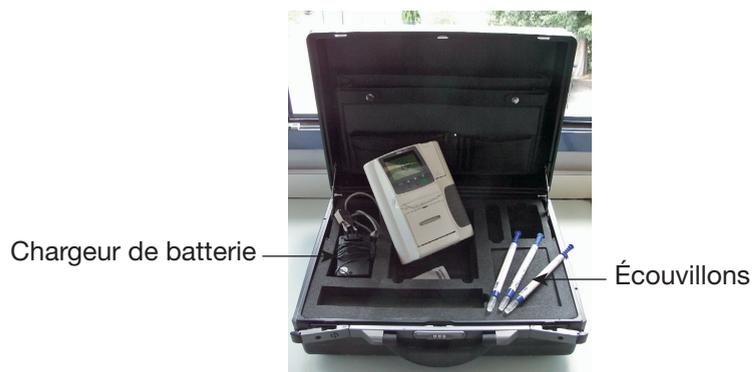
**Étape 2 : diagnostic hygiène (valeurs attendues pour une hygiène optimale)**

	Surface lisse et accessible lors du nettoyage et/ou matériau non poreux (acier inoxydable)	Surface peu accessible lors du nettoyage et/ou matériau rugueux/poreux (plastique, bois, ciment)*
ATP sur 100 cm <sup>2</sup> (RLU)	<b>0-150</b>	<b>150-750</b>

**Précaution :**

Ces valeurs indicatives sont à moduler selon le stade (traitement de la vendange et vinification/élevage et conditionnement) et à confronter avec les méthodes boîte de Pétri et épifluorescence.

\*Points critiques : joints, raccords, tuyaux souples/fixes/coudés, robinets et vannes, couvercles, purges...



L'ATP-mètre peut être transporté sur le lieu de prélèvement bien qu'il soit également possible de ne réaliser l'analyse qu'au retour au laboratoire (si l'opercule n'a pas été perforé).