

ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Recommandations pour la mise en œuvre des analyses microbiologiques.

Recommandations pour le choix du matériel de filtration

Pour la filtration, nous recommandons l'usage :

- Des membranes filtrantes en esters de cellulose de 47 mm de diamètre, à bords hydrophobes quadrillées de 0.45 µm de porosité de couleur noire.
- D'un système de filtration + pompe à vide.

Préconisations pour la mise en œuvre de la filtration

- 1) Passer à l'alcool et à la flamme tout le système de filtration.
- 2) Retirer la membrane filtrante de son emballage individuel stérile avec une pince flambée et refroidie préalablement.
- 3) Placer sur la base du support filtre la membrane filtrante, qui doit être centrée, quadrillage vers le haut.
- 4) Fixer l'entonnoir sur le support filtre avec une pince de fixation appropriée.
- 5) Verser quelques mL d'eau stérile pour provoquer une bonne adhérence de la membrane au support-filtre et laisser couler totalement.
- 6) Verser le volume à filtrer (500 mL à 10mL*) de l'échantillon préalablement homogénéisé. Il faut toujours verser un volume connu d'échantillon.
- 7) Faire le vide.
- 8) Après filtration, rompre le vide avec soin pour éviter le reflux.
- 9) Retirer l'entonnoir et saisir la membrane avec la pince flambée refroidie et la déposer sur le milieu de culture, dans la boîte de Petri, quadrillage vers le haut.
- 10) Eviter la formation de bulles d'air entre la membrane et le milieu (cela empêcherait un contact homogène et par conséquent un développement microbien correct).
- 11) Retourner la boîte et incuber à l'étuve le temps et dans les conditions de culture préconisés selon les micro-organismes que l'on veut détecter. (cf. FP)

** Si l'on souhaite filtrer un faible volume (< 10 mL), ajouter préalablement de l'eau distillée stérile ou de l'eau peptonée stérile.*

Recommandations pour le choix du volume filtré et la mise en œuvre éventuelle de dilutions

Pour dénombrer les micro-organismes, le nombre de colonies après culture doit être compris entre 20 et 200 UFC (Unité Formant Colonies) par boîte (pour des boîtes d'un diamètre de 55 mm).

En fonction du stade d'élaboration du vin ou de la matrice (moût en fermentation ou non, vin en fermentation ou non, vin en élevage ou après conditionnement) la charge en micro-organismes varie et le volume de vin mis en oeuvre doit donc être adapté.

Pour les matrices dont la population microbienne est faible, il convient d'augmenter le volume de vin filtré.

Pour les matrices dont la population microbienne est élevée, une ou plusieurs dilutions sont nécessaires.

Le facteur de dilution dépend de l'estimation de la quantité présumée de micro-organismes présents dans l'échantillon. Cette estimation peut être réalisée en effectuant un état frais de l'échantillon à traiter.

Les dilutions doivent être réalisées dans des conditions stériles, c'est-à-dire à l'aide de pipettes et de tubes stériles ainsi que d'eau distillée stérile ou bien d'eau peptonée stérile.

Pour réaliser une dilution d'un facteur 10, il est recommandé de placer 1 mL de matrice à analyser dans 9 mL de liquide stérile (eau distillée ou peptonée). Les 10 mL peuvent être ensuite filtrés sur membrane comme indiqué § 2.

Conditions de culture

Les conditions de culture doivent être adaptées en fonction des micro-organismes que l'on souhaite dénombrer.

Levures Moisissures	Levures	Levures <i>Brettanomyces</i>	Bactéries acétiques	Bactéries lactiques	Bactéries totales	Flore totale
25°C (température constante = mise à l'étuve)						
2 à 5 jours	2 jours	7 jours	6 jours	12 jours	12 jours	12 jours
Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Aérobie*	Aérobie	Aérobie

* Utiliser des kits d'anaérobiose (jarre pour culture anaérobiose + générateur d'anaérobiose + indicateur d'anaérobiose).

Les boîtes doivent être conservées à l'envers durant tout le temps d'incubation.