

## **UTILISATION DE L'ÉPIFLUORESCENCE POUR LA DÉTECTION DES MICROORGANISMES DANS LE VIN**

Isabelle FROUDIÈRE\*, Françoise LARUE et Aline LONVAUD

Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II,  
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

Les méthodes normalisées de numération de la flore totale du vin sont basées sur le dénombrement des microorganismes (levures et bactéries) capables de former des colonies sur un milieu gélosé nutritif et sélectif après une incubation de 48 heures à 25°C.

Ce temps de réponse est trop long pour modifier au cours d'un tirage les conditions de mise si la qualité microbiologique est insuffisante. Pour répondre à ce besoin de rapidité, il existe une technique d'analyse qui utilise l'épifluorescence. Elle est couramment utilisée en laiterie et pour le contrôle des eaux. Elle a été appliquée pour le contrôle des vins (COOTES et JOHNSON, 1980). En 1988 nous l'avons utilisé pour le suivi de la fermentation alcoolique (FROUDIÈRE et LARUE, 1988).

Dans cette note nous donnons une méthode pour la détermination des levures viables dans des vins pauvres en germes (au moment de la mise en bouteille), et nous comparons les résultats à ceux obtenus par la méthode de référence (comptage des colonies sur milieu nutritif).

### **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### *a) Matériels*

- Un microscope axioskop 20 ZEISS équipé d'un bras d'épifluorescence, d'une lampe à vapeur de mercure HBO-50 watts, d'un filtre d'excitation 450-490 nm, d'un miroir dichroïque 510 nm, d'un filtre d'arrêt à 520 nm, d'objectifs néofluar (20 et 40) offrant une image fluorescente plus lumineuse.

- Des membranes Millipore en polycarbonate de 13 mm, 16 mm ou 25 mm de diamètre et de 0,8  $\mu\text{m}$  de calibre ou en acétate de cellulose de 45 mm de diamètre et de 0,45  $\mu\text{m}$  de calibre.

- Un appareil de filtration sous vide composé d'un entonnoir et d'un porte-filtre, d'une fiole à vide et d'une pompe manuelle ou électrique à vide.

---

\* Stagiaire de recherche de la société Laffort, détachée à l'Institut de Bordeaux.

- Lames dégraissées à l'alcool et lamelles.
- Gants de protection.

#### b) Réactifs

- Tampon phosphate pH 7,4 stérile.
- Colorants : de l'acridine orange ou de la primuline dissous dans un litre de tampon phosphate pH 7,4 et stérilisés par filtration. Ce pH est important car il représente la valeur optimale pour la propriété fluorescente des colorants.
- Alcool isopropylique.
- Huile à immersion non fluorescente.
- Milieu de dénombrement sur boîte de Petri composé de volumes égaux de moût de raisin dilué au demi et de solution gélosée à 15 % (méthode de référence).

Les déterminations sont réalisées sur des vins prélevés après préfiltration et sur la chaîne d'embouteillage.

#### c) Méthodes

##### 1°) Méthode par épifluorescence

Une membrane en polycarbonate est déposée, face brillante au dessus, et de manière aseptique sur un porte-filtre stérile de 13 mm ou de 25 mm de diamètre, à travers lequel on peut faire le vide. L'entonnoir stérile est ensuite placé au-dessus du support et fixé à l'aide d'une pince métallique. Après une homogénéisation par agitation magnétique, un certain volume de vin, estimé d'après l'importance de la contamination probable est filtré. Sans arrêter l'aspiration, la membrane est lavée par 30 ml de tampon phosphate. Puis le vide étant relâché, la membrane est mise en contact avec 2,5 ml de colorant pendant 5 minutes. Le colorant est alors aspiré et la membrane est de nouveau lavée par 50 ml de tampon phosphate puis par 2,5 ml d'alcool isopropylique. On maintient l'aspiration un moment afin de permettre à la membrane de sécher complètement. La membrane est déposée sur une lame dégraissée à l'alcool et recouverte d'une goutte d'huile à immersion puis par une lamelle. Cette préparation est observée à l'objectif 40 pour le comptage des levures. Le calcul permettant d'évaluer le nombre de cellules par millilitre est le suivant :

$$N = C A / x a v$$

N : nombre de cellules par ml; C : nombre de cellules comptées par x champs; A : surface de la membrane filtrante en mm<sup>2</sup>; a : surface de champs du microscope en mm<sup>2</sup>; v : volume de l'échantillon filtré en ml; x : nombre de champs observés.

##### 2°) Méthode de référence

En parallèle, les mêmes déterminations sont effectuées par la méthode de référence;

L'échantillon est filtré sur une membrane en acétate de cellulose de 45 mm de diamètre et de 0,45  $\mu\text{m}$  de calibre.

L'aspiration est coupée et la membrane est récupérée et déposée sur un milieu de dénombrement solide qui est placé à l'étuve à 25°C pendant 48 à 72 heures.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### a) *Application de l'épifluorescence sur des vins contenant des populations levuriennes de l'ordre de $10^2$ cell/ml*

Pour le dénombrement des levures par épifluorescence, nous avons testé comparativement à la méthode de référence, deux fluorochromes; l'acridine orange, colorant très utilisé dans la pratique et la primuline. Les observations ont porté sur plusieurs vins et pour chaque vin on a effectué 4 à 9 déterminations. Les résultats obtenus sont irréguliers avec la primuline, par contre ils sont fiables et homogènes avec l'acridine orange.

De cette première étude, il résulte que :

Pour des vins ayant une forte densité de microorganismes ( $> 10^2$  levures/ml), il suffit de compter 10 à 30 champs pris au hasard pour obtenir une fidélité à 95 %.

La primuline ne semble pas être un colorant fiable pour le dénombrement des levures par épifluorescence. De plus elle ne permet pas de différencier les levures vivantes des levures mortes.

L'utilisation de l'épifluorescence avec un colorant approprié tel que l'acridine orange, donne des résultats fiables et précis, ainsi qu'une bonne corrélation avec la méthode de référence.

De plus il est possible de différencier les levures viables des levures mortes, ainsi que les levures des bactéries. Dans la suite de notre étude sur l'épifluorescence, seul ce colorant sera utilisé.

### b) *Application de l'épifluorescence sur des vins pauvres en germes.*

Habituellement, les vins prélevés sur la chaîne d'embouteillage présentent peu, voire pas du tout de levures. Nous avons donc testé la méthode par épifluorescence sur ce type de produit afin de vérifier si la fiabilité et la corrélation avec la méthode de référence sont aussi bonnes que sur des vins riches en microorganismes. Étant donné la présence de diverses précipitations dans le vin, le volume filtré est de 375 ml et le temps de filtration est augmenté. En outre, plus le nombre de microorganismes présents dans le vin est faible plus le nombre de champs comptés doit être élevé pour avoir des résultats fiables.

Les résultats obtenus pour un type de vin sont donnés à titre d'exemple dans le tableau I.

**TABLEAU I**  
**Comparaison du nombre de levures viables par épifluorescence  
 et par méthode de référence sur un vin pauvre en germes.**

Bouteilles	NOMBRE DE CELLULES PAR BOUTEILLE	
	Epifluorescence	Référence
1	4	6
2	1	1
3	3	2
4	8	11
5	5	8
6	4	3
7	3	2
8	6	11
9	4	2
10	6	3

En conclusion, dans les conditions de vin pauvre en germes, on a pu montrer que :

Le volume de vin à filtrer dépend de la concentration des germes. Plus elle est faible, plus le volume de l'échantillon nécessaire sera grand.

Le nombre de champs qu'il faut examiner au microscope est fonction de la densité de cellules sur la membrane. Si aucune cellule n'est visible sur un certain nombre de champs, le comptage doit être effectué sur la totalité de la membrane si on veut obtenir un résultat rigoureux et fiable.

### **Remerciements**

Nous remercions la société Zeiss (Paris et Toulouse) pour le prêt du microscope à épifluorescence et de ses accessoires ainsi que la société de négoce Deluze pour son aimable coopération.

Note reçue le 27 juin 1990.

### **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

COOTES R.L., JOHNSON R., 1980. A fluorescent staining technique for determination of viable and non-viable yeasts and bacteria in wineries. *Food technology in Australia*, **32**, N° 10, 522-524.

FROUDIÈRE I., LARUE F., 1988. Détermination par épifluorescence des levures vivantes dans le moût de raisin. *Conn. Vigne Vin*, **22**, N° 3, 237-240.