Connaissance Vigne Vin, 1988, **22,** N° 3, 237-240.

NOTE

Détermination par épifluorescence des levures vivantes dans le moût de raisin

Isabelle FROUDIÈRE et Françoise LARUE

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

Dans le domaine du vin, le dénombrement des microorganismes vivants est devenu une technique courante. Il est effectué soit pour le suivi des fermentations alcoolique et malolactique, soit pour le contrôle microbiologique lors de la mise en bouteilles.

La méthode par culture sur milieu gélosé et comptage des colonies visibles est parfaitement adaptée mais elle présente l'inconvénient de ne donner de résultats qu'après un délai de trois à quatre jours dans le meilleur des cas. Elle est la méthode la plus utilisée et peut être considérée comme référence. La bioluminescence a été appliquée au dénombrement des microorganismes dans le vin par LONVAUD-FUNEL et JOYEUX (1982). Elle permet d'obtenir rapidement un résultat (1 heure). Toutefois, elle ne permet pas de différencier les levures des bactéries et actuellement elle n'est pas utilisable pour dénombrer quelques cellules par litre (cas du contrôle avant la mise en bouteilles); il est possible de l'utiliser pour vérifier si un échantillon est ou non stérile (réponse en une dizaine d'heures).

Le dénombrement direct des microorgasnismes par épifluorescence, appliqué dans l'industrie laitière (PETTIPHER et *al.,* 1980), dans le vin (COOTES et JOHNSON, 1980) et dans le contrôle des eaux (DELATTRE, 1986) est présenté comme une méthode rapide et fiable. Il nous a semblé intéressant de vérifier, si elle était utilisable pour suivre la population levurienne au cours de la fermentation alcoolique.

MÉTHODE

I — PRINCIPE

En présence d'un colorant, l'acridine orange, les cellules vivantes présentent une fluorescence verte (fixation de l'acridine sur l'ADN) et les cellules mortes une fluorescence orange (fixation de l'acridine sur l'ARN). Après coloration les cellules sont comptées sur cellule de MALASSEZ à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

II — RÉACTIFS

a) *Tampon phosphate à pH 7,4*

b) Colorant

60 mg d'acridine orange (Merck) sont dissous dans 1 litre de tampon phosphate pH 7,4 (ce pH est important car il représente la valeur optimale pour la propriété fluorescente de l'acridine). Ce réactif doit être conservé au maximum un mois à + 4°C. Au delà de ce délai, il perd sa réactivité.

Les deux réactifs sont stérilisés par filtration sur membrane.

c) *Matériel*

- cellule de MALASSEZ
- centrifugeuse
- microscope à fluorescence équipé :

• d'un dispositif d'éclairage composé d'une lampe à vapeur de mercure haute pression de 50 Watts et de longueur d'onde de 490 nm avec un ensemble de filtres d'excitation et d'arrêt ainsi que d'un miroir dichroïque.

• de diaphragmes de champ et d'ouverture.

• d'un éclairage de Koelher.

• d'objectifs achromatiques plan et semi-plan offrant des images fluorecentes particulièrement lumineuses

d) *Mode opératoire*

Diluer le moût en fermentation pour avoir environ 5 x 10^6 cellules/ml. Prélever 1 ml de la dilution après homogénéisation. Centrifuger 3 minutes à 12.000 g, laver le culot avec 3 fois 1 ml de tampon. Après lavage introduire 1 ml du colorant et laisser 5 minutes en contact.

Éliminer l'excès de colorant par 2 lavages avec le tampon et mettre le culot en suspension dans 1 ml de tampon.

Porter une goutte du liquide sur la cellule de MALASSEZ et examiner sous un grossissement de 250 diamètres. On retient la moyenne des numérations effectuées sur cinq rectangles et on rapporte le nombre de cellules au ml

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un moût de raisin commercial est ensemencé par une levure sèche active (*Saccharomyces cerevisiae,* souche 713) à raison de 2 x 10^6 cellules/ml.

La répétabilité de la méthode est étudiée à partir de 10 prélèvements du même échantillon effectués au même moment et elle est comparée à la méthode par comptage des colonies (Tableau I).

TABLEAU I

Répétabilité du dénombrement des levures par comptage des colonies et par épifluorescence.

N°	Nombre (x 10^6) cellules de levures par ml	
	Méthode par comptage des colonies	Méthode par épifluorescence
1	3,47	3,4
2	3,56	3,4
3	3,41	3,8
4	3,62	3,7
5	3,61	3,4
6	3,39	3,8
7	3,61	3,6
8	3,42	3,6
9	3,61	3,7
10	3,49	3,8
Moyenne	3,52	3,62
Écart-type	0,13	0,16
Coefficient de variation (%)	3,8	4,4

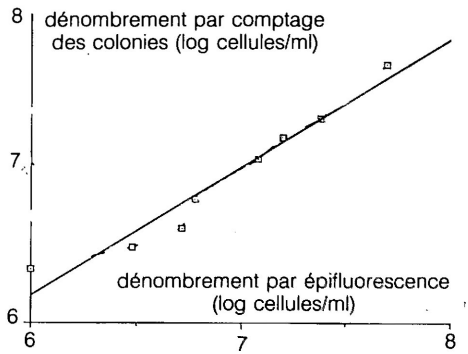


Fig. 1. — Corrélation entre la méthode de comptage des colonies et la méthode par épifluorescence, pour le dénombrement des levures.

La moyenne est de 3,52 pour la méthode par comptage des colonies et de 3,62 pour la méthode par épifluorescence. Le coefficient de variation est de 3,8 p. 100 pour la méthode par comptage des colonies et de 4,9 p. 100 pour la méthode par épifluorescence

Au cours de la fermentation alcoolique du moût on suit l'évolution de la population levurienne viable par les deux méthodes sur huit prélèvements. La figure 1 indique la corrélation existant entre les résultats obtenus. L'équation de la droite est $y = 1,23 + 0,813 x$ avec $r = 0,97$. On voit qu'il existe une bonne concordance entre les deux méthodes. Il est à noter que le résultat est obtenu en 15 minutes par épifluorescence alors que par comptage des colonies il faut 72 heures.

En conséquence, il est possible d'utiliser valablement cette méthode pour le dénombrement des microorganismes. Elle présente l'avantage d'un gain de temps par rapport à la méthode classique, dont le délai d'obtention des résultats est un inconvénient majeur. Du point de vue qualitatif, cette méthode permet de dénombrer non seulement les microorganismes viables, mais aussi les non-viables, et ceci quelle que soit leur nature; levures et bactéries sont différenciées par leur taille, alors qu'il est nécessaire d'employer des milieux sélectifs pour la méthode de comptage des colonies. On évite donc des coûts et des manipulations supplémentaires.

Ainsi, la méthode par épifluorescence dont nous avons testé la fiabilité présente de nombreux avantages, et il serait intéressant de l'appliquer aux contrôles de la qualité des vins sur les chaînes d'embouteillage.

Remerciements

Nous remercions la société Cofralab (Bordeaux), et plus particulièrement M. SAINT-EDMOND, pour le prêt du microscope à épifluorescence.

Note reçue le 5 septembre 1988.

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.

DELATTRE J.M., 1986. Le contrôle bactérien rapide des eaux par épifluorescence. *Journal Français d'hydrologie,* **17,** N° 1, 59-70.

LONVAUD-FUNEL A. et JOYEUX A., 1982. Application de la bioluminescence au dénombrement des microorganismes vivants dans les vins. *Connaissance Vigne Vin,* **16,** N° 4, 241-256.

PETTIPHER G.L., MANSELL R., McKINNON C.H. et COUSINS C.M., 1980. Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Envir. Microbiol.,* **39,** 423-429.