

MICROBIOLOGIE

REGLES GENERALES POUR LES TRAVAUX BIOLOGIQUES

La condition première pour obtenir des résultats microbiologiques fiables est de travailler en conditions stériles.

Lors de l'exécution des travaux, les mesures de précaution suivantes doivent être prises :

1. l'endroit où l'on travaille doit être le plus propre possible et les déplacements d'air doivent être évités. Les portes et fenêtres ne doivent donc en aucun cas rester ouvertes.
2. le poste de travail doit être propre et aseptisé. Pour cela il doit être lavé avec une solution à 1‰ d'une base désinfectante d'ammonium quaternaire et avec de l'alcool à 70°. Ces produits désinfectants ne doivent pas rentrer en contact avec la peau ou avec des substrats nutritifs ou de culture.
3. Le poste de travail doit être suffisamment et correctement éclairé, mais sans lumière du soleil directe.
4. les vêtements de travail doivent être propres
5. Les mains et avant-bras doivent être lavés au savon avant de débiter le travail. Il est conseillé de couvrir les cheveux pendant les travaux.
6. Les substrats nutritifs, les liquides diluants, etc., qui sont utilisés doivent être stériles.
7. Les instruments avec lesquels on travaille doivent être autoclavés ou stérilisés comme suit :

Les laver avec un détergent bactéricide et les sécher avec du papier absorbant, les imbiber d'alcool à 70° et les placer sous une hotte à flux laminaire, les flamber avec un bec bunsen en s'assurant que l'ensemble des instruments ait été en contact avec la flamme. Dans le cas du porte-filtre il est important de le laisser refroidir avant de placer la membrane stérile de 0,45 ou de 0,2 µm.

1. CONTROLE MICROBIOLOGIQUE PAR FILTRATION ET INCUBATION SUR MILIEU NUTRITIF

Une fois que le matériel de filtration est stérilisé et préparé, on procède à la filtration de l'échantillon, en prenant 200 ml de vin et en les passant à travers une membrane stérile de 0,45 ou 0,2 µm.

La membrane utilisée pour la filtration est placée dans une boîte de Petri sur un pad de cellulose imbibé en milieu de culture Millipore 2T pour un comptage total.

Une fois la boîte de Petri refermée, la placer dans une étuve pour incubation à 32°C pendant 48 H.

Observation :

Après ces 48h, le développement des microorganismes (levures, bactéries ou moisissures) est observé à la loupe binoculaire et les unités formant colonies (UFC) sont comptées.

Remarque : lorsque ce type de contrôle est réalisé durant le procédé de vinification, il conviendra de faire des dilutions adéquates.

2. CONTROLE MICROBIOLOGIQUE PAR OBSERVATION:

Technique par comptage par épifluorescence. Acridine.

Peser 0,01 gr d'acridine orange et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée au préalable portée à ébullition pendant 10 minutes. Filtrer à travers une membrane de 0,45µm et maintenir stérile.

Prélever avec une seringue (Sartorius ou équivalent) 40 ml de vin lorsqu'il provient d'une ligne d'embouteillage ou 10 ml lorsqu'il provient d'une cuve. Filtrer sur un porte filtre de 13 mm de Ø à travers une membrane de 0,6 µm pour le vin provenant d'une cuve et de 0,2 µm pour le vin provenant d'une ligne d'embouteillage.

Avec une seringue jetable de 5 ml prendre 3 ml d'acridine orange. Installer un filtre stérile de 0,2 microns sur le porte-filtre. Placer le filtre utilisé pour filtrer le vin sur ce filtre de 0,2 µm. Déposer 2 ml d'acridine et laisser buvarder pendant 1 minute. Il est possible d'utiliser 1-2 ml d'isopropanol pour entraîner l'excès de colorant.

Sécher la membrane, la placer sur une lame porte-objet, ajouter de l'huile d'immersion Merck, placer une lamelle couvre-objet, y mettre une goutte d'huile et observer au microscope avec un objectif de 100 x 1,25.

Pour cela amener la lentille de l'objectif au contact de l'huile pour en assurer l'immersion. Le parcours de la membrane doit être en zig-zag en prenant 10 champs au hasard, et en commençant à l'extrémité inférieure de la lame.

Expression du résultat:

$n \times 25$ = nombre de microorganismes présents.

n = nombre de microorganismes observés dans 10 champs.

25 = facteur afin de ramener le nombre de microorganismes au litre.

3. OBSERVATION DIRECTE AU MICROSCOPE

L'échantillon doit être centrifugé pendant 10min à 3500 rpm puis le surnageant éliminé. Agiter vigoureusement le culot pour le re-suspendre. Placer une goutte sur la lame porte-objet et recouvrir immédiatement avec une lamelle couvre-objet.

Ajouter une goutte d'huile d'immersion et observer avec un objectif d'immersion (cf protocole ci-dessus).

4. TECHNIQUE A L'EUCRESINE

Matériel:

Membrane de polycarbonate de 0,2 µm de porosité et de 13 mm de Ø.

Réactifs:

Eucrésine 2GNX : 0,006 g/l dans un tampon phosphaté à un pH 7,4, filtrée avec une membrane de 0,45 µm.

Technique:

Après avoir filtré à travers une membrane de 0,2 µm, 40 ml de vin prélevé avec une seringue aseptisée, laver délicatement tout en continuant de filtrer, le filtre avec une solution physiologique stérile, afin d'éliminer les résidus de sucre ou les composants organiques qui peuvent nuire à une bonne observation.

Introduire alors dans l'entonnoir au dessus du porte-filtre, 2 à 3 ml de colorant.

En aspirer une partie et laisser en contact 1 ml avec la membrane pendant 1 minute. Faire passer le reste du colorant en lavant avec 1 ml d'isopropanol, et aspirer afin de sécher immédiatement la membrane.

Placer la membrane sur une lame porte-objet, puis recouvrir avec une lamelle couvre-objet. Déposer une goutte d'huile d'immersion.

Faire une lecture au microscope avec un objectif à immersion (objectif de 10 x 1,25) en comptant les champs au hasard en zig-zag.

Expression des résultats:

$n \times 25$ = nombre de bactéries ou levures par litre.

n = nombre de microorganismes

25 = facteur pour déterminer le nombre de microorganismes par litre.

Remarque :

Pour les bactéries, si vous souhaitez réaliser une étude plus complète, il faut alors réaliser une culture spécifique et une coloration GRAM ou poursuivre avec une technique d'identification spécifique de chaque espèce (technique de type membranaire, Gram, etc...)

Les méthodes 1, 2, 3 et 4 s'appliquent aux levures comme aux bactéries

5. COMPTAGE DES LEVURES.

Matériel:

Cellule de Thoma

Technique:

On procède à l'aide d'une cellule possédant 25 carrés, eux-mêmes divisés en 16 petits carrés, c'est à dire par cellule : $25 \times 16 = 400$ carrés. Une goutte de la solution à compter est déposée sur la cellule puis recouverte par une lamelle et observée avec un objectif à immersion.

Quand la quantité de levures est importante, le comptage se fait sur 5 carrés.

Résultats :

Quantité de levures par millilitre = $(n / 5) \times 16 \times 25 \times 10000$

La surface de la chambre est de 1mm^2
n = nombre de cellules comptées.