

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
ET MICROBIOLOGIE**

N° :



**DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE**

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

**OPTION : NUTRITION ET SCIENCE
DES ALIMENTS**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du diplôme de Master Académique**

**Par: GHERBI Latifa
GHERBI Ahlam**

Intitulé

**Effet d'un extrait de *Cinnamomum* sp. sur
la cinétique de croissance d'une levure osmophile
et xérophile isolée à partir du fruit dattier**

Soutenu devant le jury composé de:

Dr. AOUN Omar	Université de M'sila	Président
Dr. BELBAHI Amine	Université de M'sila	Rapporteur
Dr. MADI Nadia	Université de M'sila	Examinatrice

Année universitaire : 2020 /2021



Dédicaces

Je dédie ce travail :

- ✚ À la mémoire de mes chers parents ALLAH yarhamhoum.
- ✚ À mon mari et mes adorables enfants WALID et BILEL.
- ✚ À mes chers frères et sœurs, neveux et nièces.
- ✚ À mon beau-frère le professeur KHIATI pour son aimable soutien.
- ✚ À tous ceux qui ont sacrifié leur temps pour la science et à tous ceux qui utilisent la science pour le bien et la prospérité de l'humanité.

Latifa

Je dédie ce travail :

- ✚ Mes chers parents
- ✚ À mes frères, ma sœur, mon neveu Imad et ma nièce Dounia
- ✚ À mon grand père et ma tante.

Ahlam

Remerciements



الحمد لله الذي تتم بنعمته الصالحات و الحمد لله الذي انعم علينا بنور العلم و أعاننا على إتمام مذكرة تخرجنا من الجامعة بعد خمس سنوات من الجد والعمل.

Nous tenons à remercier notre encadreur le Dr BELBAHI Amine de nous avoir fait confiance pour effectuer ce travail colossal dont il nous a honorées, de nous avoir dirigées, aidées et orientées durant toute la période de notre stage et d'avoir été patient et compréhensif. Nous sommes aussi fières d'avoir été ses étudiantes durant ces trois dernières années, d'avoir profité de son savoir et d'avoir assisté avec un grand plaisir à ses fructueux cours. Puisse ALLAH le récompenser et lui permettre d'atteindre les plus hauts niveaux dans son parcours professionnel.

Nous remercions infiniment le Dr AOUN Omar et le Dr MADI Nadia pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions également tous nos enseignants, sans exception, qui ont illuminé nos cinq années d'études universitaires. Ainsi que tout le personnel administratif du département de microbiologie et biochimie et du socle tronc commun SNV, les ingénieurs de laboratoires pour leur collaboration, y compris les agents de sécurité et les femmes de ménage qui nous ont encouragées et souhaitées du succès.



RÉSUMÉ

L'objectif du présent travail est d'isoler une levure d'altération de la datte *Deglet-Nour* ; modéliser sa cinétique de croissance ; évaluer l'effet inhibiteur d'un extrait de *Cinnamomum* sp. sur la croissance de celle-ci ; valider la croissance sur trois matrices liquides à savoir un jus de dattes, un lait au sirop de dattes et un jus de dattes au citron. La levure osmophile a été qualifiée de xérophile et osmophile capable d'altérer des dattes riches en sucre avec des humidités intermédiaires. Il a été constaté un effet inhibiteur notable de l'extrait de *Cinnamomum* sp. sur la croissance de cette levure sur milieu Sabouraud. Cet effet se traduit par une prolongation du temps de latence ainsi qu'une diminution des taux de croissance ; où une concentration de 2 mg/ml d'extrait a donné une inhibition totale de la levure. Cependant cet effet inhibiteur de l'extrait a été atténué par l'effet matrice des trois jus. Ces résultats méritent d'être plus exploités pour un objectif de conservation des aliments par des substances naturelles et d'optimiser leur utilisation. Il serait souhaitable de réaliser toutes les cinétiques à l'aide d'un lecteur de plaque ou bien dans un fermenteur où les conditions de croissance sont mieux maîtrisées. Cela engendrera des données qui peuvent être modalisées pour une comparaison plus précise.

Mots clés: Dattes ; boissons ; cinétique de croissance ; modélisation, extrait de *Cinnamomum* ; levure osmophile.

ABSTRACT

The objective of this work is to isolate spoilage yeast from the Deglet-Nour date; model its growth kinetics; to assess the inhibitory effect of a *Cinnamomum* sp. extract on its growth; validate the growth on three liquid matrices, namely date juice, date syrup milk and lemon date juice. Osmophilic yeast has been described as xerophilic and osmophilic capable of spoiling dates rich in sugar with intermediate humidities. A noticeable inhibitory effect was found with *Cinnamomum* sp. extract on the growth of this yeast on Sabouraud medium. This effect results in an extension of the latency time as well as a decrease in growth rates; where a concentration of 2 mg / ml of extract gave complete inhibition of the yeast. However, this extract inhibitory effect was mitigated by the matrix effect of the three juices. These results deserve to be further exploited for the purpose of preserving food with natural substances and optimizing their use. It would be desirable to carry out all the kinetics using a plate reader or else in a fermenter where the growth conditions are better controlled. This will generate data that can be modified for a more accurate comparison.

Keywords: Dates; beverages; growth kinetics; modeling; *Cinnamomum* extract; osmophilic yeast.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل خميرة التغيير والافساد من تمور دقلة نور و نمذجة حركية نموها ؛ لتقييم التأثير المثبط لمستخلص

Cinnamomumsp.

على نموها ثم التحقق من صحة النمو في ثلاث مصفوفات او نماذج سائلة ، وهي عصير التمر وحليب شراب التمر وعصير التمر بالليمون. وصفت الخميرة الأسموفيلية بأنها زيروفيليك و أوسموفيليك قادرة على إفساد التمور الغنية بالسكر ذات الرطوبة المتوسطة. تم العثور على تأثير مثبط ملحوظ مع خلاصة سينامومومسب. على نمو هذه الخميرة على وسط سابورو. ينتج عن هذا التأثير إطالة زمن الركود بالإضافة إلى انخفاض معدلات النمو ؛ حيث أعطى تركيز 2 مغ / مل من المستخلص تثبيط كامل للخميرة. ومع ذلك ، تم تخفيف هذا التأثير المثبط للمستخلص من خلال تأثير المصفوفة للعصائر الثلاثة. تستحق هذه النتائج مزيداً من الاستغلال لغرض الحفاظ على الطعام بالمواد الطبيعية وتحسين استخدامها. سيكون من المرغوب فيه تنفيذ جميع الخواص الحركية باستخدام قارئ لوحة أو في مخمر حيث يتم التحكم في ظروف النمو بشكل أفضل. سيؤدي ذلك إلى إنشاء بيانات يمكن تعديلها للحصول على مقارنة أكثر دقة.

الكلمات المفتاحية: التمور, المشروبات, حركية النمو, النمذجة, مستخلص سيناموموم سب, خميرة اوسموفيلية

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
ملخص	III
SOMMAIRE	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Fruit dattier	3
1.1. Description générale	3
1.2. Développement et maturation.....	4
2. Altérations	6
2.1. Altérations physique	6
2.2. Altérations chimiques	6
2.3. Altération par les insectes et les parasites	6
2.4. Altérations microbiologiques	7
3. Levures	9
3.1. Cellule levurienne.....	9
3.2. <i>Candida apicola</i>	10
4. Microbiologie prévisionnelle	10
4.1. Qu'est-ce que la microbiologie prévisionnelle ?.....	10
4.2. Modèles de croissance	11
5. Conservation et maîtrise du développements fongiques	14
5.1. Procédés thermiques en postrécolte.....	14
5.2. Procédés de stabilisation.....	14
5.3. Conservation par des substances antimicrobiennes naturelles	15
5.3.1. D'origine végétale	15
5.3.2. D'origine microbienne	16
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
1. Lieux de stage	18

2.	Matériels végétal.....	18
3.	Matériel biologique	18
4.	Préparation des matrices de validation.....	18
4.1.	Jus de dattes	18
4.2.	Lait au sirop de dattes	19
4.3.	Jus de dattes au citron.....	20
5.	Préparation de l'inoculum	21
5.1.	Préparation de la suspension.....	21
5.2.	Estimation de la concentration des cellules	21
6.	Préparation de l'extrait.....	22
7.	Inoculation et suivi de la croissance.....	23
7.1.	Inoculation	23
7.2.	Suivi de la croissance	23
7.3.	Méthode d'examen.....	24
8.	Modélisation de la croissance	25
8.1.	Modèle	25
8.2.	Estimation des paramètres	25
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS		26
1.	Résultats de la charge et de l'isolement.....	26
1.1.	Charge en levures osmophiles	26
1.2.	Description des levures isolées.....	26
1.2.1.	Observation visuelle des colonies	26
1.2.2.	Observation microscopique des cellules	26
2.	Estimation des paramètres du modèle de croissance... Error! Bookmark not defined.	
3.	Effet de l'extrait sur la croissance Error! Bookmark not defined.	
3.1.	Croissance sur milieu Sabouraud	Error! Bookmark not defined.
4.	Croissance sur matrices Error! Bookmark not defined.	
CONCLUSION.....		32
RÉFÉRENCES.....		33

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
AQR	Appréciation Quantitative de Risque
a_w	Activité de l'eau
CO ₂	Dioxyde de Carbone
DLC	Date Limite de Consommation
DMI	Dose Minimale Infectieuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
HACCP	Hasard Analysis Critical Control Point
OMC	Organisation Mondiale du Commerce
SM	Solution Mère
SPS	Sanitary and Phytosanitary
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant Colonie
UHT	Ultra Haute Température

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition biochimique de datte variété *Deglet Nour* (Abbès, 2011) 4

Tableau 2. Paramètres estimés du modèle Rosso et *al.*, (1995) décrivant la cinétique de croissance de levure osmophile isolée..... **Error! Bookmark not defined.**

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Fruit et graine de la datte (Belguedj, 2013).	3
Figure 2. Évolution biochimique et physiologique de la datte au cours de la maturation (Zaid et Arias Jiménez, 1999).	5
Figure 3. Cellules de levure en bourgeonnement observées au MEB (Scala, 2011).	10
Figure 4. Principales phases d'une courbe de croissance microbienne et paramètres du modèle qui la caractérise. (Belbahi, 2015).....	12
Figure 5. Diagramme de fabrication du jus de dattes.....	19
Figure 6. Diagramme de fabrication de sirop de dattes selon Belguedj (2015).	20
Figure 7. Image illustrant les différentes étapes de fabrication de Rob.	20
Figure 8. Diagramme de fabrication de jus de dattes au jus de citron.	21
Figure 9. Étapes de préparation de l'extrait	22
Figure 10. Incubation des jus inoculés dans des flacons à 25 °C.....	23
Figure 11. Aspect des colonies de levures osmophiles isolée à partir de la datte	26
Figure 12. Aspect des cellule de levures osmophiles observées au microscope photonique... ..	27
Figure 13. Cinétique de croissance de levure isolée sur milieu Sabouraud (● : valeurs expérimentales ; — : modèle)	Error! Bookmark not defined.
Figure 14. Cinétiques de croissances de la levure isolée sur Sabouraud liquide à différentes concentration de l'extrait de <i>Cinnamomum</i> sp.	Error! Bookmark not defined.
Figure 15. Cinétiques de croissances de la levure isolée sur les trois jus à différentes concentration de l'extrait de <i>Cinnamomum</i> sp.	Error! Bookmark not defined.

INTRODUCTION

Les acteurs des filières agro-industrielles doivent être capables d'assumer pleinement leur responsabilité quant à la sécurité sanitaire des denrées alimentaires qu'ils proposent. Celle-ci exige des connaissances solides et complexes sur la contamination naturelle des matières premières et des produits transformés, sur la capacité de survie des micro-organismes au cours des traitements de transformation, et leur développement aux différents stades de conservation (Couvert, 2006). De plus, ces acteurs doivent être capables de démontrer la performance de leur mesures de maîtrise des risques sanitaires mises en place. Cette performance ne peut être obtenue qu'au travers d'une démarche de modélisation des systèmes agroalimentaires et de la dynamique des contaminants rencontrés dans ces systèmes à l'aide d'outils comme la "microbiologie prévisionnelle" (Augustin, 2005).

La texture tendre, la peau fragile et la richesse en sucres dans les dattes à teneur en eau élevée (0,80-0,85 a_w) ainsi que leurs produits de transformation, constituent un environnement très favorable au développement des microflore fongiques d'altération. C'est le risque majeur lors du conditionnement et du stockage de ces dattes à humidité intermédiaire et des boissons à bases de dattes. De nombreuses espèces fongiques sont capables de produire diverses enzymes extracellulaires (pectinase, hémicellulase...) qui leur permettent de franchir la peau des dattes et d'accéder aux nutriments présents dans la pulpe (Barth *et al.*, 2010). Les levures et moisissures communément isolées à partir du fruit dattier sont : *Aspergillus sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*. Et *Saccharomyces sp*. (Sidhu, 2006). Les levures, un problème grave pour l'industrie alimentaire, elles sont responsables de la détérioration des aliments et l'espèce *Candida apicola* est l'un des agents d'altération des produits riches en sucres en particulier le fruit dattier et ses dérivés (Belbahi, 2015).

Toute solution technologique envisageable pour limiter l'impact de cette microflore d'altération, exige une connaissance du comportement de ces microorganismes cibles, vis-à-vis des facteurs physiques ou chimiques utilisés dans l'objectif de les inhiber et/ou de les inactiver (Belbahi, 2015). L'utilisation d'agents antimicrobiens naturels en tant que conservateurs alimentaires gagne de plus en plus d'importance dans l'industrie alimentaire en raison de la croissante demande des consommateurs pour les additifs alimentaires naturels (Basak, 2018).

L'objectif du présent travail est d'apprécier l'effet d'un extrait de *Cinnamomum* à différentes concentrations sur la cinétique de croissance d'une levure osmophile et xérophile sur milieu Sabouraud liquide ; évaluer l'effet de trois matrices liquides à base de dattes sur cet effet ; comparer les différentes cinétiques de croissance obtenues (milieu synthétique et matrice alimentaire).

Chapitre I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Fruit dattier

1.1. Description générale

La dénomination donnée au palmier dattier depuis 1743 par Linné est *Phoenix dactylifera* L. (Abdallah, 1990). Le mot *Phœnix* dérive du nom de Dattier chez les Grecs, qui considéraient comme l'arbre des phéniciens et dactylifera vient de latin dactylus dérivant du grec dactylis, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Absi, 2013).

La datt est le fruit du palmier dattier, en fonction des cultivars et du stade de maturité, ce fruit présente une grande variation en terme de forme, de taille et de couleur (Sidhu, 2006). La datt est une baie de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure entouré de chair. La partie comestible dite chair ou pulpe est constituée de (Espiard, 2002) :

- Un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre.
- Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau.

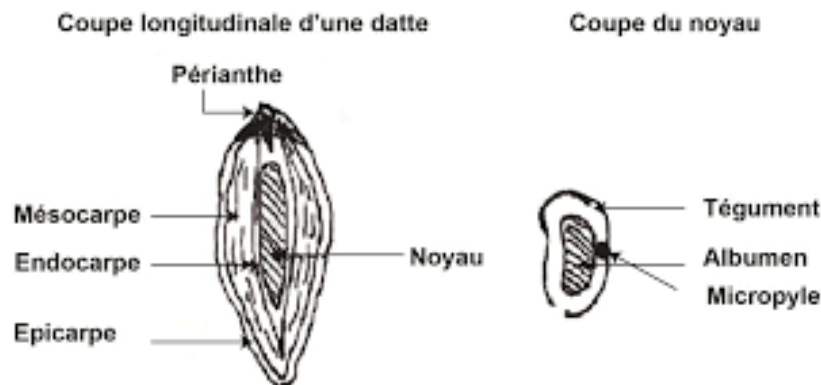


Figure 1. Fruit et graine de la datt (Belguedj, 2013).

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes (Hannachi *et al.*, 1998). La Deglet-Nourest la variété commerciale par excellence. C'est une datt demi-molle, considérée comme étant la meilleure variété de datt du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur. À maturité la datt est d'une couleur brune ambrée avec un épisperme lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse (Boudraret *et al.*, 1997 ; Kendri, 1999). Les variétés communes sont de moindre importance économique par rapport à

la Deglet-Nour ; les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla (Kendri, 1999 ; Masmoudi, 2000).

La datte est considérée depuis longtemps comme un aliment de base des populations sahariennes, mais aussi un produit diététique dont la composition biochimique détermine la qualité des dattes, et elle présente une bonne valeur alimentaire (riche en sucres et en sels minéraux). Le tableau suivant regroupe la composition biochimique de datte variété Deglet Nour (Abbès, 2011).

Tableau 1. Composition biochimique de datte variété *Deglet Nour* (Abbès, 2011)

Composant Total des solides solubles (°Brix)	75.4
L'humidité (en g/100 g de poids frais)	18.81
Sucres solubles (en g/100 g de poids sec)	77.55
Les sucres réducteurs(en g/100 g de poids sec)	23.17
Saccharose (en g/100 g de poids sec)	54.04
Polysaccharide(en g/100 g de poids sec)	17.35
Cendre (en g/100 g de poids sec)	2.291
Potassium (en mg/100 g de poids sec)	782.92
Magnésium (en mg/100 g de poids sec)	75.28
Sodium (en mg/100 g de poids sec)	5.98
Calcium (en mg/100 g de poids sec)	136.06
Zinc (en mg/100 g de poids sec)	0.478
Le phosphore (en mg/100 g de poids sec)	75.5
Protéine (en g/100 g de poids sec)	3.12
Graisses (en g/100gde poids sec)	0,687
Les phénoliques (mg de l'acide gallique par 100 g de poids sec)	253.10

1.2. Développement et maturation

Les fleurs fécondées donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte. La datte est l'un des fruits climatériques, qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (Gilles, 2000). Son processus de maturation est caractérisé par un ramollissement de la chair, une augmentation du rapport sucres/acides, un

changement de couleur, ainsi qu'elle possède une faible respiration qui décroît avec la diminution de sa teneur en eau au cours de la maturation (Lurie, 1998).

Pour des dattes stockées à 20°C, la production de CO₂ est inférieure à 25 ml.kg⁻¹.h⁻¹ au stade *Khalal*, et inférieure à 5 ml.kg⁻¹.h⁻¹ aux stades *Routab* et *Tamar* (Kader et Hussein, 2009). Les mêmes auteurs ont trouvé dans les mêmes conditions de stockage des valeurs de production d'éthylène inférieures à 0,5 µl.kg⁻¹.h⁻¹ au stade *Khalal*, et inférieures à 0,1 µl.kg⁻¹.h⁻¹ aux stades *Routab* et *Tamar*. Depuis la pollinisation jusqu'à la maturité, les dattes passent successivement par cinq stades de maturation (Al-shahib et Marshall, 2003 ; Djerbi, 1994) ; ils sont décrit dans la figure 2.

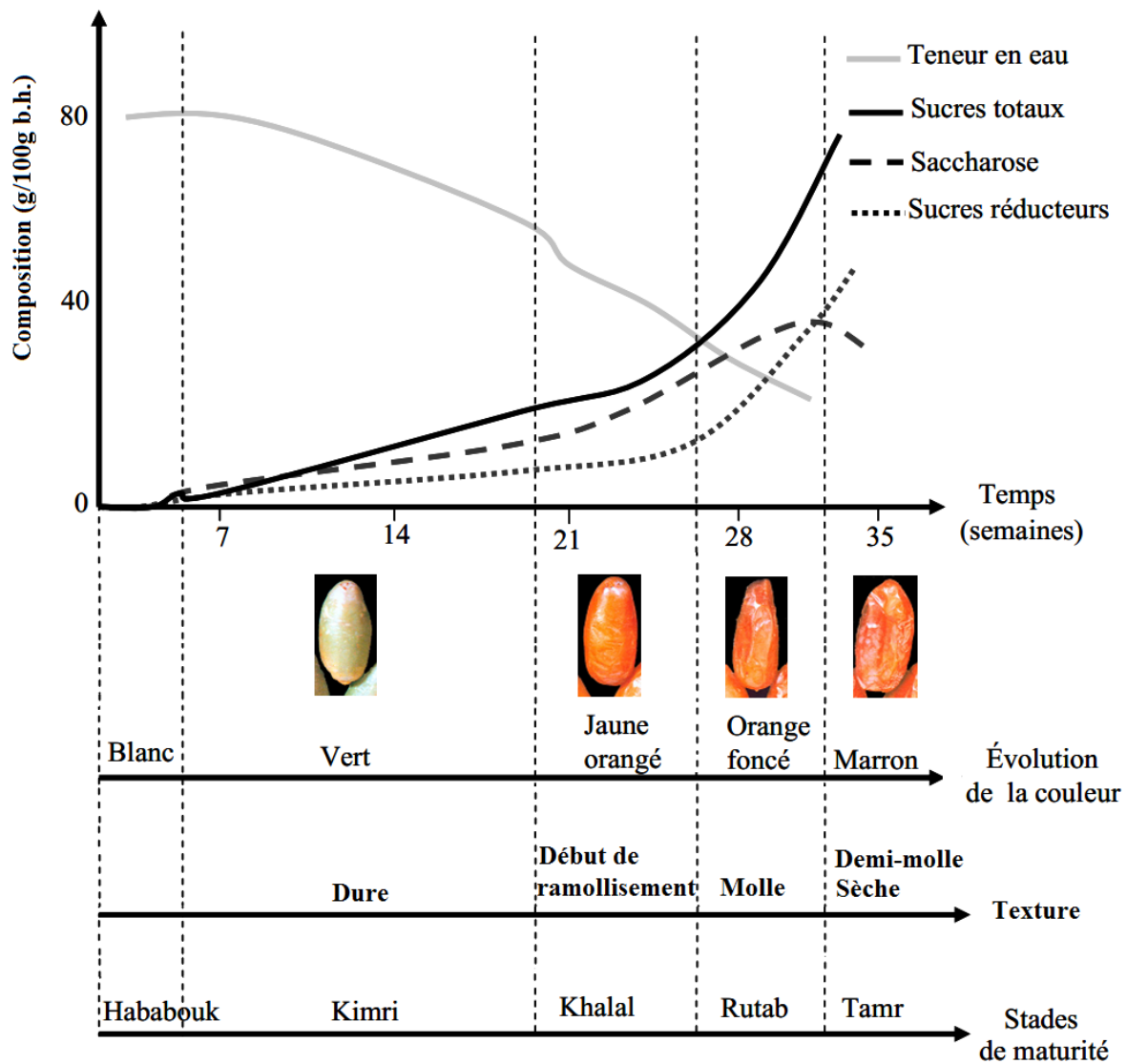


Figure 2. Évolution biochimique et physiologique de la datte au cours de la maturation (Zaid et Arias Jiménez, 1999).

2. Altérations

Comme tous fruits, la datte est sujette à de nombreuses altérations affectant ses qualités organoleptiques. Cette variété présente une faible aptitude à la conservation suite à sa fragilité aux phénomènes de dégradation. La valeur marchande de cette variété est dépréciée principalement par les fissurations, le ramollissement et ainsi que le brunissement du fruit qui sont d'origines diverses.

2.1. Altérations physique

Elles se produisent au cours des différentes opérations de manipulation des dattes que ce soit pendant la récolte ou bien dans les unités de conditionnement (chocs, écrasements et dessèchement). Ces opérations provoquent des lésions qui accélèrent les processus d'altérations biologiques notamment le déclenchement du processus de fermentation et le brunissement enzymatique (Oubahou et Yahia, 1999).

2.2. Altérations chimiques

a. SugarSpotting. La richesse de la datte en invertase provoque l'inversion du saccharose. Cette inversion peut entraîner une diminution de l'humidité relative d'équilibre de la datte et une modification de sa saveur naturelle. Par contre, toutes les variétés de dattes développent des taches de sucres ou " SugarSpotting" qui se caractérisent par la formation de dépôts granuleux de sucre juste au-dessous de la peau et dans la chair du fruit (Jarrah et al., 1982).

b. Brunissement. Durant l'entreposage ou lors de traitements technologiques, les dattes subissent deux types de brunissement (Singleton, 1987), notamment, le brunissement enzymatique et non enzymatique. Le brunissement enzymatique dû à l'oxydation des phénols par les enzymes polyphénol-oxydases et les peroxydases (Macheix et al., 1990), aboutit à la formation des mélanines (polymères bruns insolubles) (Rivas et Whitaker, 1973). Cependant, le brunissement non enzymatique dû à la réaction de Maillard entre les sucres réducteurs et les acides aminés, engendre le brunissement et la caramélisation du fruit (Matallah, 2004).

2.3. Altération par les insectes et les parasites

L'infestation des dattes par les insectes et les dommages qui en découlent est l'une des principales causes de pertes post-récolte en qualité et en quantité (Kader et Hussein, 2009). Parmi les ravageurs les plus couramment rencontrés on peut citer (Ben-Lalli, 2010) : *Esctomyeloisceratoniae*Zaller, *Ectomyeloisdecolor*Zaller, *Ephestiacalidella*Guenée, qui sont

des lépidoptères et *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coléoptères) ainsi qu'*Oligonychus afrasiaticus* (une araignée).

Les insectes ravageurs dégradent les dattes stockées et causent une perte de poids et une dépréciation de la valeur commerciale du fruit. Elles sont dues essentiellement aux vers de la datte Myeloïsphoenicie et au Bou-feroua (*Oligonychus afrasiaticus*) (Al-azawiet al., 1984).

2.4. Altérations microbiologiques

Par sa teneur équilibrée en différents sucres et sa teneur appréciable en eau constitue un milieu propice au développement d'une variabilité d'espèces microbiennes favorisant sa fermentation spontanée (Abekhti Abdelkader, 2015). Selon El-shaicket al. (1986), cette flore est constituée principalement des levures et moisissures et en moindre importance de bactéries fermentaires. Selon cet auteur, ces microorganismes ont pour la plupart des cas un impact préjudiciable sur les principaux paramètres de la qualité marchande de cette denrée alimentaire (acidité, rhéologie, flaveur...).

a. Bactéries

Les bactéries ne sont pas considérées étant la cause principale d'altération du fruit dattier, mais peuvent être impliqués dans ce phénomène notamment les bactéries lactiques (Kader et Hussein, 2009) et acétiques (Shenasi et al., 2002). Grâce à leur pouvoir fermentaire, Ces microorganismes engendrent l'aigrissement des dattes suite à la transformation des sucres en acide acétique et ou en acide lactique. Il a été rapporté que les bactéries acétiques (Kader et Hussein, 2009) ainsi que les bactéries lactiques (Shenasi et al., 2002) peuvent être responsables de cette acidification. L'acidification est amplifiée chez les dattes récoltées au stade Routab, en particulier chez les variétés molles. A côté de ces bactéries des espèces pathogènes de contamination ont été isolées de cette matrice à savoir, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Aidoo et al., 1996).

b. Microflore fongique

Les agents d'altération microbiologique de la datte sont principalement les levures et les moisissures. Les moisissures les plus couramment rencontrées chez le fruit dattier appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* (Ahmed et al., 1997 ; Gherbawy, 2001 ; Ragab et al., 2001 ; Shenasi et al., 2002b). *Asp. niger*, *Asp. flavus* et *Asp.*

fumigatus sont les espèces d'*Aspergillus* souvent rapportées dans les dattes stockées (Atia, 2011 ; Shenasi et al., 2002b). Elles sont présentes en grande fréquence 39%-83%, 40%-49% et 26%-40%, respectivement (Al-Sheikh, 2009 ; Colman et al., 2012 ; Giridhar et Reddy, 2001). D'autres espèces d'altération du genre *Alternaria* peuvent être présentes sur le fruit dattier : *Alt. alternata* (22%-62%) et *Alt. clamydospora* 24% (Al-Sheikh, 2009 ; Giridhar et Reddy, 2001). Toutes ces espèces sont capables de produire des mycotoxines, présentant ainsi un danger pour la santé des consommateurs (González, 1998 ; Logrieco et al., 2003 ; Patriarca et al., 2007 ; Schrader et al., 2006).

Les levures qui affectent les dattes sont les plus tolérantes aux fortes teneurs en sucre telles que *Zygosaccharomycesp. Et Hansenulasp.* (Ait-Oubahou et Yahia, 1999).La formation de poches de gaz sous la peau, d'agrégats blancs de cellules, de pulpe décolorée et d'odeur alcoolique sont les caractéristiques des dattes infectées par les levures (Yahia et Kader, 2011).

Le développement de la microflore fongique d'altération dépend de la température, de l'humidité de l'air de stockage, de l'activité en eau du fruit, ainsi que de la charge microbienne initiale lors de la récolte. Á part les contaminations issues du non-respect des bonnes pratiques de la récolte, la charge initiale fongique de la datte dépend du stade et de l'état physiologique de la récolte. En effet, certains stades du développement de la datte sont en mesure de soutenir la croissance fongique et la production de mycotoxines. Shenasi et al. (2002) ont rapporté pour la variété Fard, une charge fongique relativement élevée au premier stade de maturité Kimri (1,7 log₁₀CFU/g) qui augmente fortement au deuxième stade Routab (5,7 log₁₀CFU/g), puis diminue de manière significative au stade final de maturité Tamar (1,9 log₁₀CFU/g).

Le risque d'altération microbiologique est l'ennemi principal de la conservation et du conditionnement des dattes en particulier celles avec des activités en eau élevée (dattes premium et variétés de dattes molles). L'importance du risque engendré par cette altération nécessite de plus amples informations sur la microflore fongique d'altération lors du conditionnement et le stockage des dattes. Ceci englobe leur sensibilité aux traitements thermiques de décontamination, et leur inhibition sous influence de facteurs environnementaux tels que la température, l'*a_w*, l'atmosphère modifiée (enrichie en CO₂). (Belbahi, 2015).

3. Levures

3.1. Cellule levurienne

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles (figure 3). Leur masse cellulaire est 100 fois plus grande que celle des bactéries et elles se divisent 4 fois moins rapidement. De par leur croissance moins rapide, elles ne peuvent donc pas leur nuire en épuisant les réserves nutritives du milieu. Néanmoins, elles peuvent aisément supporter leur compétition. Par ailleurs, elles sont parfois utiles à d'autres microorganismes comme les bactéries lactiques à qui elles apportent les acides aminés nécessaires (Larpentet *al.*, 1990). Les levures se reproduisent selon deux modes en général :

- *Multiplication asexuée*, toujours présente, se fait essentiellement par bourgeonnement, aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées et il peut aussi être multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces* (Gournier, 1994). Dans le cas de la division par scissiparité (*Schizosaccharomyces* est le seul genre représentatif), la cellule s'allonge, le noyau s'étire et se divise en deux. Une cloison apparaît et sépare la cellule mère en 2 cellules filles de taille égale, d'où une multiplication très lente (Leblon, 1988 ; Magnet, 1997).
- *Reproduction sexuée* : dans un milieu défavorable (riche en acétate, pauvre en nutriments, températures extrêmes...), la cellule diploïde de levure va sporuler c'est à dire produire 4 ou 8 cellules haploïdes, nommées « ascospores » chez les Ascomycètes et « basidiospores » chez les Basidiomycètes, qui resteront en vie ralentie. Si les conditions du milieu redeviennent favorables, les spores sont libérées, vont germer, croître et commencer un nouveau cycle de multiplication végétative sous la forme haploïde ou diploïde (Ferreira et al., 1997 ; Hencke, 2000).

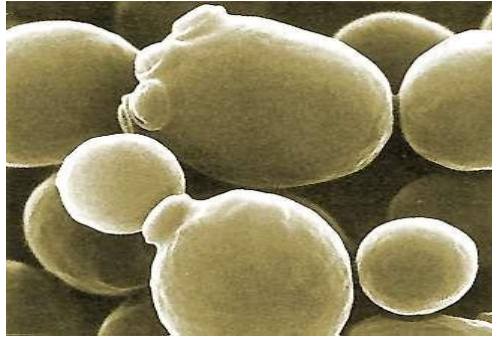


Figure 3. Cellules de levure en bourgeonnement observées au MEB (Scala, 2011).

3.2. *Candida apicola*

Candida apicola appartient à un groupe de levures produisant de grandes quantités de glycolipides extracellulaires tentiaires actifs (Girhard, 2013). Elle est xérophile, osmophile et capable d'altérer les produits riches en sucre et relativement faible en a_w tel que la datte et ses dérivés. Les altérations qu'elle cause sont l'acidification et production d'alcool et de CO_2 affectant la valeur marchande du produit.

Jusqu'à présent, seule *Saccharomyces cerevisiae* est considérée dans le contexte de son application dans le domaine de l'industrie car elle dispose d'informations plus claires, allant de sa composition cellulaire à son bénéfice, et cette espèce est également fournie en tant que levure industrielle. En outre, il existe différents types de levures, qui ont un bon potentiel dans la production de mannoprotéines, telles que *Candida apicola* et *Trichosporon beigeli*.

C. apicola est le type de levure d'ascomycètes, qui est riche en osmotolérante et que l'on trouve naturellement dans le processus de fermentation du vin (Vega *et al.*, 2015). Elle contient généralement 90% de mannoprotéines principalement mannose situé dans la membrane externe et a la fonction comme un composant structurel. Ce dernier s'associe à la glycoprotéine formant des protéines, et il existe également des α -glucanes, qui contiennent α -1,3 et α -1,6 où il se lie les uns aux autres avec la chitine formant de la N-acétyl-glucosamine (Quiroz-Villareal, 1996).

4. Microbiologie prévisionnelle

4.1. Qu'est-ce que la microbiologie prévisionnelle ?

C'est une discipline qui vise à développer des modèles mathématiques permettant de prévoir les aptitudes de croissance, survie ou décroissance des populations microbiennes dans les aliments en fonction des facteurs environnementaux influents. Pour évaluer la stabilité

microbiologique d'un aliment, ou pour évaluer leur durée de vie, des méthodes conventionnelles sont employées depuis de nombreuses années. Mais le coût élevé de ces expérimentations, et leur délai de réponse suscite un intérêt pour des systèmes de simulation sur ordinateur (Delhalle *et al.*, 2012). Préconisé par l'AFSSA ou par le règlement européen sur les critères microbiologiques dans les denrées alimentaires, la demande de modélisations mathématiques en microbiologie a été initiée dans un contexte réglementaire (European Food Safety Authority, 2010). Ses applications peuvent être résumées en (Delhalle *et al.*, 2012) :

- Détermination des dates limites de consommation (DLC) : notion de dose minimale infectieuse (DMI).
- Prédiction de la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altérations sur un aliment déterminé
- Optimisation de procédés et les adapter afin de garantir la sécurité de l'aliment : traitements thermiques, conditions de conservation...
- l'Appréciation Quantitative de Risque (AQR) (estimation de l'évolution du nombre de micro-organismes dans une chaîne de production, évaluation de l'exposition à une bactérie pathogène, conséquences de cette exposition)
- Aide au développement de nouveaux produits : formulation et procédé
- Détermination des limites critiques des facteurs environnementaux. Exemple: détermination des points critiques microbiologiques (HACCP)

La microbiologie prévisionnelle connaît un essor important depuis le début des années 80. De nombreux modèles ont été développés pour décrire le comportement bactérien en fonction des principales caractéristiques physico-chimiques des produits alimentaires (température, pH, disponibilité en eau, conservateur). La modélisation mise en œuvre se décompose en deux étapes correspondant à ce qu'on appelle modélisation primaire et modélisation secondaire. Les modèles primaires décrivent l'évolution de la densité bactérienne au cours du temps, et les modèles secondaires expriment l'effet des facteurs physico-chimiques environnementaux sur les paramètres des modèles primaires (Couvert, 2006).

4.2. Modèles de croissance

Un modèle primaire de croissance a pour but de décrire l'évolution au cours du temps d'un microorganisme bien défini dans un environnement donné. Il découle de ce modèle une courbe de croissance classiquement divisée en 5 phases (Figure 4) :

- a. Phases de latence (λ) où la population initiale ($N^{(0)}$) est constante et la vitesse de croissance (μ) est nulle ;
- b. Phase d'accélération où $\mu > 0$;
- c. Phase exponentielle où la vitesse de croissance atteint son niveau maximum (μ_{max}) ;
- d. Phase de décélération où la vitesse de croissance maximale diminue ($\mu < \mu_{max}$) ;
- e. Phase stationnaire où la population ($N^{(t)}$) atteint sa concentration maximale (N_{max}).

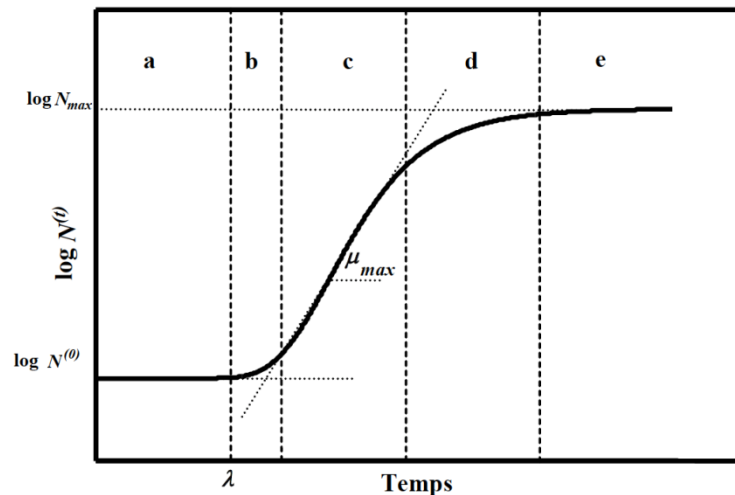


Figure 4. Principales phases d'une courbe de croissance microbienne et paramètres du modèle qui la caractérise. (Belbahi, 2015)

Plusieurs modèles primaires de croissance ont été proposés pour décrire la cinétique de croissance des populations microbiennes dans un environnement donné. Les plus connus sont les modèles :

- ✓ Zwietering *et al.* (1990),
- ✓ Rosso (1995)
- ✓ Baranyi et Roberts (1994)

Zwietering *et al.* (1990) ont adapté le modèle *Gompertz* en faisant apparaître les paramètres classiques d'une courbe de croissance avec une signification microbiologique :

$$\log(N^{(t)}) = \log(N^{(0)}) + A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Avec $A = \log(N_{max}) - \log(N^{(0)})$ et $e = \exp(1)$.

Ce modèle qui génère des courbes sigmoïdales a été couramment utilisé en raison de sa qualité d'ajustement sur les données expérimentales de croissance. Néanmoins, des

inconvénients ont été signalés. Rosso (1995) a mentionné que l'ajustement du modèle de Gompertz reparamétré induit une surestimation du taux de croissance μ_{max} par rapport à sa définition classique (phase c de la figure 4). Rosso (1995) ont donc développé un modèle dit logistique avec délai et rupture, limitant les problèmes évoqués ci-dessus :

$$\log (N^{(t)}) = \begin{cases} \log (N^{(0)}) & , \quad t \leq \lambda \\ \log (N_{max}) - \log \left[1 + \left(\frac{N_{max}}{N^{(0)}} - 1 \right) \exp(-\mu_{max}(t - \lambda)) \right] & , \quad t > \lambda \end{cases} \quad (2)$$

Le modèle de Baranyi et Roberts (1994) est aussi l'un des modèles les plus utilisés pour représenter les courbes de croissance. Il s'ajuste très bien aux données expérimentales de croissances (bonne qualité d'ajustement) et possède des paramètres avec des significations mécanistiques. Cependant, le modèle de Baranyi reste très complexe et moins utilisé que celui de Rosso (1995).

$$\frac{dN^{(t)}}{dt} = \mu_{max} N^{(t)} a(t) b(t) \quad (3)$$

$$a(t) = \frac{q_0}{q_0 + \exp(-\mu_{max} t)} \quad (4)$$

$$b(t) = 1 - \frac{N^{(t)}}{N_{max}} \quad (5)$$

Où $a(t)$ est la fonction d'ajustement croissante en fonction de t , qui converge vers 1 (varie entre 0 et 1), et permet la transition de la phase de latence à la phase exponentielle. $b(t)$ est la fonction de freinage décroissante en fonction de $N^{(t)}$, qui converge vers 0 (varie aussi entre 0 et 1), et permet la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Le paramètre q_0 est donné par h_0 qui caractérise l'état physiologique de l'inoculum ($N^{(0)}$):

$$h_0 = \mu_{max} \lambda = \log \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (6)$$

La forme intégrée du model deBaranyi et Roberts (1994) est donnée par l'équation suivante :

$$N^{(t)} = N^{(0)} + \mu_{max} A^{(t)} - \log \left\{ 1 + \frac{\exp [\mu_{max} A^{(t)} - 1]}{\exp [N_{max} - N^{(0)}]} \right\} \quad (7)$$

Avec :

$$A^{(t)} = t + \frac{1}{\mu_{max}} \log \left\{ 1 + \frac{\exp[-\mu_{max} t] + q_0}{1 + q_0} \right\} \quad (8)$$

Le modèle Baranyi et Roberts (1994) s'ajuste très bien aux données expérimentales de croissance (bonne qualité d'ajustement) et possède des paramètres avec des significations mécanistiques.

5. Conservation et maîtrise des développements fongiques

5.1. Procédés thermiques en post récolte

Les traitements thermiques peuvent être utilisés pour lutter contre les levures et les moisissures d'altération (Vicente et al., 2002). Ce traitement physique a été efficace également pour lutter contre les insectes et les ravageurs en post-récolte (Ben-Lalli et al., 2011). Ce processus physique traditionnel de décontamination est encore d'usage aujourd'hui, car il est efficace, sain et peu coûteux par rapport à d'autres technologies telles que les procédés chimiques et l'irradiation (rayon Gamma) (Da Silva et Gibbs, 2009). La chaleur peut être appliquée aux fruits et légumes de plusieurs façons : par immersion dans de l'eau chaude, par air chaud pulsé ou par vapeur (Lurie, 1998), ou bien par un rinçage à l'eau chaude avec brossage (Fallik, 2004).

5.2. Procédés de stabilisation

Contrôle de la température, le froid. La réfrigération est une technique très efficace pour prolonger la durée de vie des fruits et légumes. Il s'agit d'un stockage à des températures supérieures à la température de congélation commençante et au-dessous de 15°C (Cai et al., 2006). L'action du stockage réfrigéré concerne la maîtrise des points suivants (Karel et Lund, 2003) :

- La croissance des microorganismes d'altération.
- Les réactions chimiques associées à la dégradation de la couleur (brunissement, oxydation...) et la perte de la valeur nutritive.
- Les activités post récolte métaboliques (le vieillissement en raison de la maturation).
- La perte d'eau.

Contrôle de l'activité de l'eau, le séchage. L'objectif du séchage est d'abaisser la teneur en eau d'un produit, et par conséquent son aw jusqu'à obtenir un produit

microbiologiquement stable à température ambiante. L'abaissement de l' a_w par séchage est une technique souvent utilisée pour prolonger la durée de vie de certains fruits riches en eau (George et al., 2004). La teneur en eau optimale recherchée pour la conservation d'un fruit dépend de l' a_w minimale du développement des microorganismes cibles responsables de l'altération. La technique de séchage la plus traditionnelle est le séchage au soleil, mais elle n'est pas sans inconvénients (poussière, attaque par les insectes, brunissement...). Industriellement la technique du séchage par entraînement (air-chaud) est largement utilisée ; des techniques ont récemment émergé telles que le séchage par microonde, par radiofréquences et par rayonnement.

Contrôle de l'atmosphère, conditionnement sous atmosphère modifiée

Contrôle de l'atmosphère, conditionnement sous atmosphère modifiée. La durée de conservation des fruits et légumes peut être prolongée par la modification de l'atmosphère environnant de ces produits que ce soit dans l'emballage (Modified Atmosphere Packaging, MAP) ou dans des chambres de stockage avec une atmosphère contrôlée. Les produits frais se conservent plus longtemps sous CAS que sous MAP, car la composition de l'atmosphère sous MAP a tendance à changer avec l'activité respiratoire et l'activité microbologique du fruit (Erkmen, 2012). Par ailleurs la perméabilité du film d'emballage aux gaz modifie aussi la composition. Les trois principaux gaz utilisés sont le CO₂, le N₂ et l'O₂, seuls ou en combinaison (Sandhya, 2010).

5.3. Conservation par des substances antimicrobiennes naturelles

5.3.1. D'origine végétale

La majorité des composés végétaux antimicrobiens sont identifiés comme des métabolites secondaires, étant principalement d'origine biosynthétique terpénoïde ou phénolique. Les autres sont des enzymes hydrolytiques et des protéines agissant spécifiquement sur les membranes des microorganismes (Vigers, 1991).

En général, les herbes et les épices et plusieurs de leurs constituants antimicrobiens sont généralement reconnus comme sûrs (GRAS), soit en raison de leur utilisation traditionnelle sans impact néfaste documenté, soit en raison d'études toxicologiques dédiées. Leur application pour la conservation des aliments devrait être facilitée par cette caractéristique, mais à ce jour les plantes sont encore une source mal exploitée comme agents antimicrobiens alternatifs. L'énorme potentiel des plantes en tant que source de composés

antimicrobiens est bien illustré par Wilkins et Board(1989), qui rapportent plus de 1389 plantes comme sources potentielles de produits chimiques verts.

De plus, chaque fois qu'une plante est considérée comme exploitée comme source de produits chimiques verts, une évaluation approfondie de sa valeur devra être effectuée par rapport à l'économie de sa culture et à la production réelle de produits chimiques verts (qu'il s'agisse de l'ensemble de la culture, un extrait ou un composé purifié), la valeur marchande de cette préparation antimicrobienne et les coûts de passage par les procédures législatives. De nombreuses sources potentielles peuvent ne pas réussir cette évaluation (Smid, 2007). Les substances les plus rapportées par la bibliographie appartiennent aux :

- Phytoalexines
- Acides organiques
- Des composés phénoliques
- Les huiles essentielles et leurs composants

5.3.2. D'origine microbienne

Les micro-organismes produisent une large gamme de composants qui influencent la croissance d'autres micro-organismes présents dans leur environnement. Souvent, ces composants augmentent l'avantage concurrentiel du microorganisme producteur et, en tant que tels, sont une caractéristique importante de leur survie et de leur prolifération. En ce qui concerne la conservation des aliments, les microorganismes les plus importants connues comme une source de bioconservateurs sont les Lactobacilles LAB (Smid, 2007). Ces derniers, pendant longtemps, ont été utilisés dans la fermentation des aliments pour produire des produits alimentaires stables (ex. fromage, saucisses, choucroute...). Ces produit avec leurs LAB et les substances antimicrobiennes qu'ils produisent ont été consommés traditionnellement sans effet négatif sur la santé, ce qui leur conféré aux LAB le statut de GRAS (Gorris and Bennik1994).

LAB peut produire à la fois des composés antimicrobiens avec un spectre d'inhibition relativement large (des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène) ainsi que des composés avec un spectre antimicrobien plutôt étroit (bactériocines). L'utilisation des LAB en tant que bioconservateurs est possible via l'application de l'organisme producteur en tant que culture dite protectrice au produit alimentaire et en s'appuyant sur sa prolifération et la compétition qui en résulte avec les microorganismes à négatifs. Alors que l'utilisation de

cultures protectrices dans la plupart des pays doit seulement être déclarée sur le produit, l'utilisation de métabolites antimicrobiens tels que les bactériocines est soumise à des règles et réglementations spécifiques dans la législation alimentaire (Abee, 1995).

Chapitre II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Lieux de stage

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques du département de Microbiologie et de Biochimie de l'université de M'sila.

2. Matériels végétal

Un extrait de *Cinnamomum* sp. aqueux nous a été fourni par une doctorante du laboratoire BBBS de l'université de Béjaia.

3. Matériel biologique

Pour avoir une charge représentative de microorganismes dans les échantillons de dattes récoltées, 1g prélevé sur 5 dattes pour chaque échantillon sont mélangés. Les levures osmophiles sont dénombrées sur milieu OGYA (Oxytetracycline Glucose Yeast Agar) supplémenté de 20 % bs de saccharose. Des dilutions décimales sont réalisées en vue des dénombrements. L'ensemencement est effectué en surface avec 200 µL de suspension. L'incubation est effectuée à 25°C pendant 5 jours. Trois boîtes ont été ensemencées pour chaque dilution. Une fois les colonies dénombrées, des colonies de levures sont isolées.

4. Préparation des matrices de validation

4.1. Jus de dattes

Les dattes sont lavées, égouttées 4h sur papier filtre et étuvées à 45°C pendant 12 h. Ensuite elles sont broyées pour obtenir une pâte à laquelle on rajoute de l'eau aux proportions (1V / 3V). Ce mélange est porté à ébullition pendant 5 minutes suivi d'une filtration sur toile. Le filtrat est pasteurisé à 63° pendant 20 minutes. Selon Cheikh-Rouhou (2006), ce jus doit subir une microfiltration et une clarification enzymatique. Cette partie du protocole n'a pas été réalisée. Cependant, il a été réalisé une filtration sur toile, et au lieu d'étuver à 45°C pendant 12 h, un séchage aux microondes pendant 2 minutes a été réalisé.

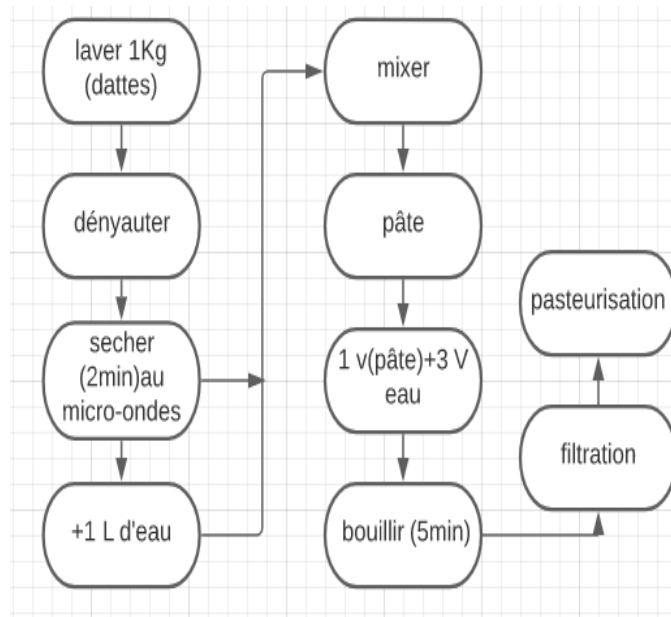


Figure 5.Diagramme de fabrication du jus de dattes

4.2. Lait au sirop de dattes

Procédé de fabrication du sirop de dattes (Rob) est décrit comme suit : après triage et lavage, les dattes sont trempées pendant 24 heures dans une eau propre pour ramollir les parois. Les dattes sont cuites dans un excipient en cuivre avec un rapport d'eau et dattes de 3/1, durant 3 h à feu modéré (60 - 70 °C), avec couvercle pour garder tous les arômes. Une filtration à l'aide d'un tissu à gaze et d'un essorage rigoureux est réalisée pour extraire le maximum de jus. A ce moment on ajoute 4 à 5 abricots secs (hermès) comme acidifiant (pratique traditionnelle). On remettra à cuire pour 5 à 10 minutes à ébullition, pour concentrer notre Rob. Ce procédé a été inspiré de Belguedj (2015) avec modification. Cette dernière est apportée suite à une enquête effectuée auprès d'artisans et de personnes connaisseurs de la région de M'sila.

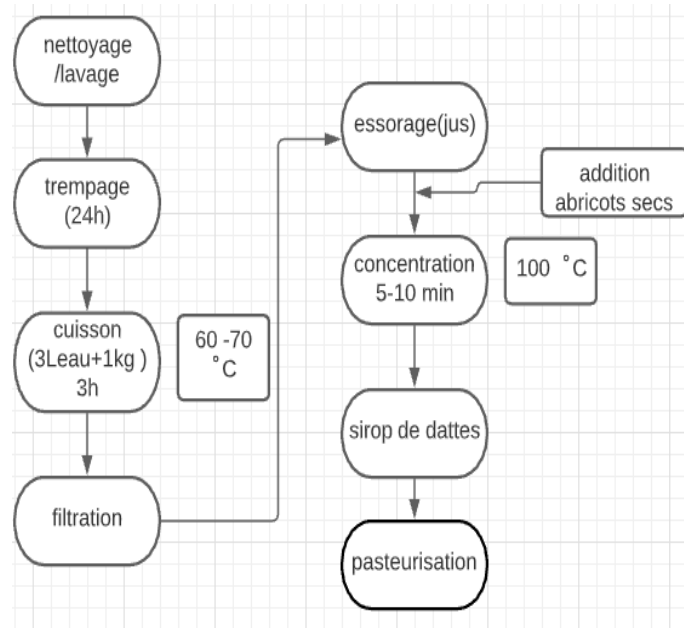


Figure 6. Diagramme de fabrication de sirop de dattes selon Belguedj (2015).

Le lait au sirop de dattes est obtenu par le mélange d'une quantité de Robe préparé (15%) à une quantité de lait UHT (85%). Ces proportions ont été déterminés par ajout de Rob jusqu'à obtention d'un pH entre 6,3 et 6,6 (EDC, 1996).

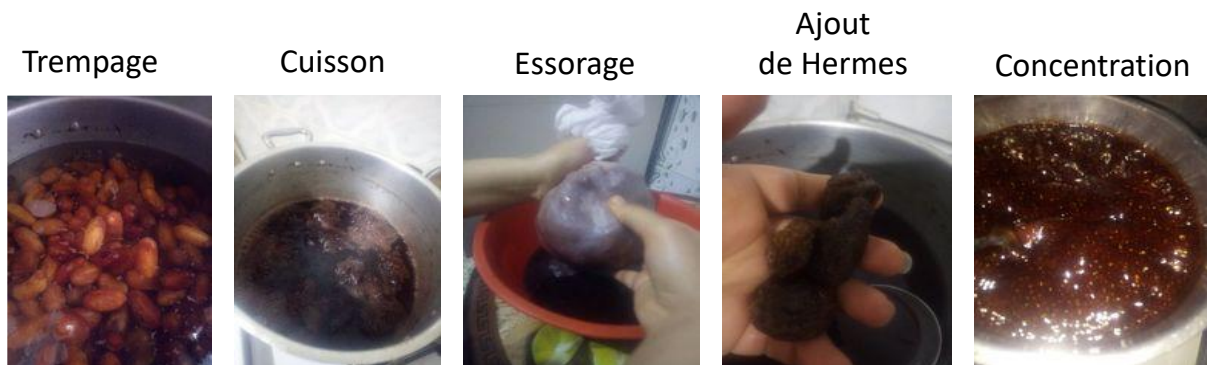


Figure 7. Image illustrant les différentes étapes de fabrication de Rob.

4.3. Jus de dattes au citron

Les dattes *Deglet-Nour* sont lavées et dénoyautées avant de les sécher au microondes pendant 2 minutes. Mixer les dattes avec de l'eau avec un rapport de 1/3 (V/V). Le jus obtenu est filtré à travers un papier filtre. Le citron pressé est ajouté graduellement au jus de datte jusqu'à obtention d'un pH de 3,11. Ce mélange a été pasteurisé au bain-marie à 63°C pendant 20 minutes (Harrak *et al.*, 2009).

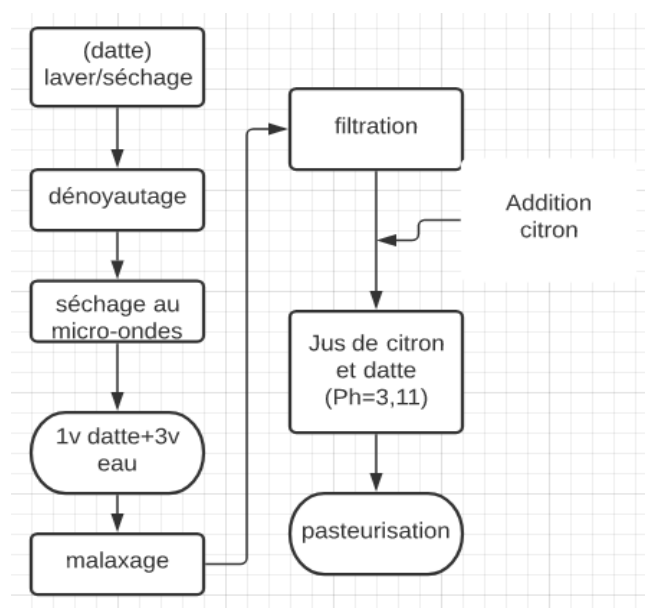


Figure 8. Diagramme de fabrication de jus de dattes au jus de citron.

5. Préparation de l'inoculum

5.1. Préparation de la suspension

Les cultures précédemment conservées ont été cultivées sur milieu Sabouraud à 25°C pendant 5 jours. Après incubation, la morphologie et l'aspect des colonies ont été observés à l'œil nu au recto-verso sur les boîtes. De plus, une observation microscopique de quelques colonies à l'état frais a été réalisée sous lame et lamelle via un microscope optique.

Trois colonies de la levure ont été introduites dans un tube en pyrex contenant de l'eau physiologique stérile, puis homogénéisé au vortex. Pour estimer la charge de cette suspension, une goutte de celle-ci est déposée à la surface d'une cellule de Thoma puis couverte par une lamelle. La cellule de comptage a un volume défini et est subdivisée en carrés à la surface de la lame, voir l'annexe 2. La numération est réalisée sous microscope en champ clair (objectif x 40).

5.2. Estimation de la concentration des cellules

Un nombre moyen C de cellules comptées dans cinq carrés de 0,2 mm de côté est estimé. Le nombre de cellule T dans un échantillon exprimé en cellules/ml est (EBC, 2001) :

$$T = C \times 0,25 \times 10^6 \times f \quad (9)$$

f étant facteur de dilution.

Une concentration de la solution mère SM d'environ 8 log est préparée à partir de la solution brute. Cette concentration est préparée en réalisant une dilution avec un volume V du milieu Sabouraud liquide. La formule suivante est utilisée pour estimer le volume V à ajouter :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (10)$$

6. Préparation de l'extrait

L'extrait ajouté au milieu Sabouraud et trois matrices est préparé comme suit : 300 mg d'extrait ont été pesés dans un papier aluminium à l'aide d'une balance de précision. Cette quantité a été dissoute dans 15 ml de DMSO dans un bécher et agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Le DMSO est un réactif organique hautement polaire qui possède des propriétés de solvant exceptionnelles pour les produits chimiques organiques et inorganiques.

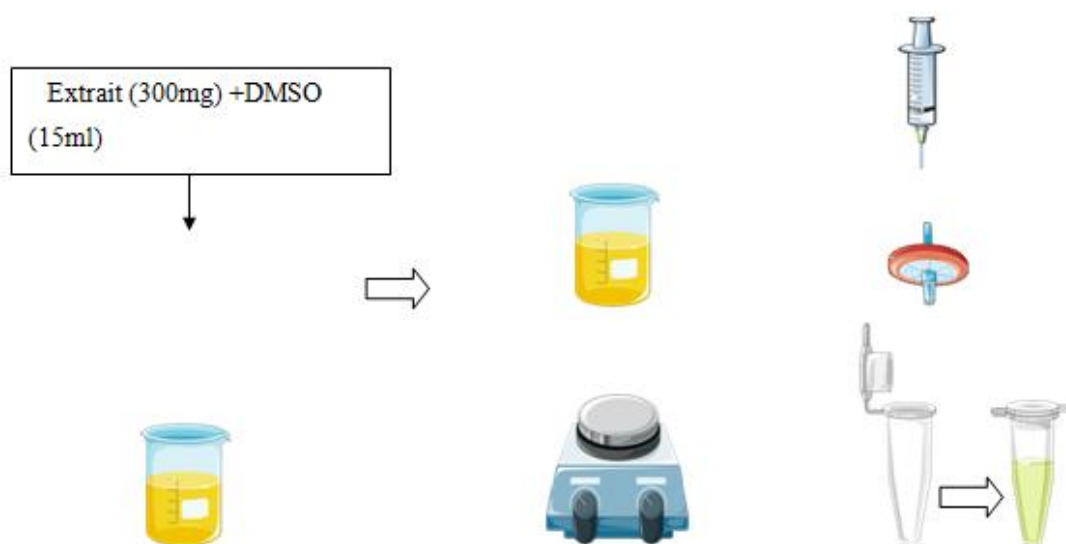


Figure 9. Étapes de préparation de l'extrait

Pour éviter d'utiliser un traitement thermique destructeur pour stériliser, l'extrait a été filtré à travers d'un microfiltre (membrane $< 10 \mu\text{m}$) et récupéré dans un tube Eppendorf stérile. Cette microfiltration élimine les micro-organismes ainsi que les microparticules, les macromolécules comme les polymères, en suspension et certains virus. Elle est utilisée dans les domaines suivants. On parle de filtration stérilisante lorsque l'objectif premier de la microfiltration mise en œuvre est d'éliminer les micro-organismes. La filtration stérilisante possède un intérêt particulier pour les produits renfermant des molécules thermosensibles qui ne peuvent subir de stérilisation par la chaleur.

7. Inoculation et suivi de la croissance

7.1. Inoculation

Un volume de 1 ml d'extrait a été ajouté dans des tubes contenant 9 ml de suspension mère. Ces tubes sont vortexés pour homogénéiser. 15 tubes contenant chacun 5 ml de milieu Sabouraud stérile ont été préparés. Avec une micropipette, 5 ml de la solution mère sont transférés à un tube contenant 5 ml de Sabouraud liquide pour obtenir une dilution 1/2. Puis, 5 ml sont prélevés de ce tube et transférés à un tube contenant 5 ml de Sabouraud liquide pour obtenir une dilution 1/4. Réaliser ces dilutions en cascade pour obtenir des dilutions allant jusqu'à 1/32. Vortexer à chaque fois pour obtenir une suspension homogène. Un tube contenant la suspension sans extrait et un autre contenant uniquement du Sabouraud liquide sont considérés comme témoins. Tous les essais sont incubés dans une étuve à 25°C.

L'inoculation des matrices est effectuée d'une manière à obtenir 8 log dans la suspension mère. Dans des flacons contenant 13,5 ml de jusensemencé, 1,5 ml d'extrait est ajouté. Par la suite des dilutions, telles que décrites précédemment, sont effectuées pour obtenir l'effet de la concentration de l'extrait sur la croissance de levure. Tous les flacons sont incubés dans une étuve à 25°C.



Figure 10. Incubation des jus inoculés dans des flacons à 25 °C.

7.2. Suivi de la croissance

Avec des pas de temps allant d'une heure jusqu'à trois jours (selon la vitesse de croissance de la levure), 10 µL sont prélevés des tubes et la charge des cellules est estimée en utilisant la cellule de Thoma ; la méthode de comptage est décrite précédemment.

La croissance de cette levure dans le milieu Sabouraud liquide a été suivie également en utilisant une microplaque à 96 puits. La lecture de la densité optique à 600 nm réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan-PC infinite M200 Pro, Australia).

7.3. Méthode d'examen

En cas de numération de levure flocculante, le milieu de suspension doit être de l'acide sulfurique à 0,5 %, afin d'éviter la floculation, mais ceci interdit la possibilité de coloration au bleu de méthylène et le comptage des cellules viables et des cellules mortes. Déposer l'échantillon sur la lame à l'aide d'une pipette à bout fin, en suivant l'un des deux modes opératoires énoncés ci-dessous.

- a. Mode opératoire 1: Bien mélanger la suspension de levure puis diluer si nécessaires. En cas de coloration au bleu de méthylène, effectuer la coloration sur l'échantillon le plus dilué en mélangeant 1 ml d'échantillon avec 1 ml de solution de bleu de méthylène avec agitation permanente. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et déposer une petite goutte de suspension de levure (diluée au besoin) sur chacune des deux zones quadrillées de la lame. Recouvrir avec la lamelle couvre-objets dans les 20 secondes qui suivent et presser fermement avec les pinces. La zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole (EBC, 2001).
- b. Mode opératoire 2 : Disposer la lamelle couvre-objets rigide de sorte que les deux cellules de comptage soient également couvertes. Utiliser les pinces pour presser la lamelle couvre-objets sur le support jusqu'à ce qu'une irisation apparaisse (anneaux de Newton). En l'absence de pinces, ne pas déplacer la lamelle couvre-objets en remplissant la cellule. Agiter en permanence la suspension de levure. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et laisser une petite goutte d'échantillon couler entre l'hémocytomètre et la lamelle couvre-objets. Procéder de même dans l'autre partie de la lamelle. La zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole. Laisser la lame préparée reposer pendant trois minutes, de façon à ce que les cellules de levure se déposent, et la placer sous le microscope. Compter 10 carrés moyens dans chaque zone quadrillée. Des procédures normalisées doivent être définies, afin d'éviter de compter deux fois le même carré.

Les cellules en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation supérieure ou droite ne sont pas prises en compte, celles en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation inférieure ou gauche sont comptées.

Les cellules de levure en bourgeonnement sont comptées comme une seule cellule si la taille du bourgeon est inférieure à la moitié de celle de la cellule mère, dans le cas contraire

les deux cellules sont comptées. Pour obtenir une numération précise des cellules, il est recommandé de compter en moyenne au minimum un total de 200 à 500 cellules de levure. L'écart de numération entre les deux côtés de la lame doit être inférieur à 10 %. Si une dilution est utilisée, le facteur de dilution doit être intégré dans le calcul (EBC, 2001).

8. Modélisation de la croissance

8.1. Modèle

Les données de croissance (DO) issues du lecteur de plaque ont été tracées en fonction du temps et le modèle logistique de croissance (Rosso et *al.*, 1995) a été utilisé pour ajuster les données expérimentales:

$$\log(N^{(t)}) = \begin{cases} \log(N^{(0)}) & , \quad t \leq \lambda \\ \log(N_{\max}) - \log\left[1 + \left(\frac{N_{\max}}{N^{(0)}} - 1\right) \exp(-\mu_{\max}(t - \lambda))\right] & , \quad t > \lambda \end{cases} \quad (11)$$

Avec $\log(N^{(t)})$, la concentration de cellules totales à un instant t donné de l'incubation, $\log(N^{(0)})$ la concentration initiale de cellules végétatives et $\log(N_{\max})$ la concentration maximale de cellules totales (CFU/ml), λ le temps de latence (h) et μ_{\max} le taux de croissance spécifique maximal (h^{-1}). Une courbe d'étalonnage présentée dans l'annexe XX est utilisée pour convertir les paramètres exprimés par des DO en concentration de cellules.

8.2. Estimation des paramètres

Les paramètres du modèle de Rosso et *al.*, (1995) ont été ajustés en utilisant le Toolbox « *cftool* » de Matlab (The MathWorks Inc, V 2018, Natick, MA, États-Unis). La racine carrée de la somme des écarts (*RMSE*, Root Mean Square Error) entre les données expérimentales et les données prédites ainsi que le coefficient de détermination ont été utilisés comme indicateurs de la qualité d'ajustement du modèle.

Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Résultats de la charge et de l'isolement

1.1. Charge en levures osmophiles

L'analyse microbienne classique de la population des levures osmophiles dans les dattes a révélé une charge moyenne de $1,3 \times 10^2$ UFC/g de datte. Cette charge est supérieure à celle rapportée par Belbahi (2005) sur la même variété de datte utilisée dans cette étude. Cet auteur a révélé que la charge fongique d'altération de la datte est présente en surface du fruit.

1.2. Description des levures isolées

1.2.1. Observation visuelle des colonies

L'observation des colonies de levures osmophiles isolées sur milieu Sabouraud (figure 11) a révélé les caractères suivants : les colonies ont une forme sphérique, d'une taille plus ou moins importante, avec une couleur blanche crèmeuse et un aspect lisse légèrement bombé de côté recto, sur la face verso les colonies sont blanches, plates et lisses.



Figure 11. Aspect des colonies de levures osmophiles isolée à partir de la datte

1.2.2. Observation microscopique des cellules

L'observation au microscope optique de quelques colonies à l'état frais donne des cellules végétatives de formes différentes (ronde, ovale, sous forme de talles) agglutinées et de tailles plus au moins variables (figure 12). Cette différence de caractéristiques morphologiques observée est due à l'état cellulaire ou les cellules sont engagées dans la phase

de division. Par conséquent, cela nous a permis de suivre le mode de reproduction de cette souche qui est le bourgeonnement (reproduction asexuée) et qui caractérise la plupart des levures (Dankova *et al.*, 1998).

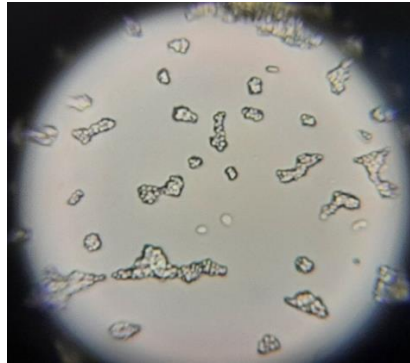


Figure 12. Aspect des cellules de levures osmophiles observées au microscope photonique.

Le résultat de l'examen macroscopique (colonies) et microscopique correspond bien aux descriptions de *Candida apicola* isolée à partir de la *Deglet-Nour* par Belbahi *et al.* (2005). Cette levure est qualifiée d'osmophile et xérophile et qui peut se développer facilement sur de la datte à humidité intermédiaire avec un taux de sucre totaux dépassant 70%.

CONCLUSION

Le présent travail a mis en évidence un effet inhibiteur de l'extrait de *Cinnamomum* sp. sur la croissance d'une levure osmophile et xérophile isolée à partir de la datte de variété *Deglet-Nour*. Cet effet se traduit par une prolongation du temps de latence ainsi qu'une diminution des taux de croissance ; où une concentration de 2 mg/ml d'extrait a donné une inhibition totale de la levure. Ces observations ont été vérifiées sur un milieu de culture de laboratoire (Sabouraud liquide) ont été vérifiés sur des matrices liquides à savoir un jus de dattes, un lait au sirop de dattes et un jus de dattes au citron. Ces derniers ont eu un effet positif sur la croissance de la levure ; autrement dit, l'effet inhibiteur de l'extrait a été estompé par les différents jus.

Ces résultats méritent d'être plus exploités pour un objectif de conservation des aliments par des substances naturelles et optimiser leur utilisation. Il serait souhaitable de réaliser toutes les cinétiques à l'aide d'un lecteur de plaque ou bien dans un fermenteur où les conditions de croissance sont mieux maîtrisées. Cela engendrera des données qui peuvent être modalisées pour une comparaison plus précise.

REFERENCES

A

- Abdallah, A. B., 1990. La phoeniciculture. (ed.) Les systèmes agricoles oasiens, Montpellier: CIHEAM. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens, (11).
- Absi, R., 2013. Analyse de la diversité variétale du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L.: Cas des Ziban (Région de Sidi Okba). Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra.
- Abee, T., Krockel, L., and Hill, C., (1995). Bacteriocins, modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning, Int. J. Food Microbiol. P. 28-169
- Al-shahib, W., and Marshall, R. J. (2003). The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? International Journal of Food Sciences and Nutrition 54, 247-259
- Al-Sheikh, H. (2009). Date-palm fruit spoilage and seed-borne fungi of Saudi Arabia. Research Journal of Microbiology 4, 208-213.
- Anadon, A., Larranaga, M.R.M., Ares, I., Martinez, M.A. (2016). Prebiotics safety and Toxicity in R.C. Gupta. (Ed). Nutraceuticals Efficacy, Safety and Toxicity. 757-775. Elsevier, UK.
- Augustin, J. C. (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. École Nationale Vétérinaire d'Alfort (France). Repéré à http://www.symprevious.net/vars/fichiers/pub_defaut/these_HDR_Jean_Christophe.pdf.

B

- Balia, R., Putranto, W.S., Gumilar, J., Widjastuti, T., Suryaningsih, L., & Utama, G.L. (2020). Mannoprotein Production by *Candida apicola*, *Trichosporon beigelli*, and *Saccharomyces cerevisiae* in Bean Sprouts Media.
- Basak, S. (2018). Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population. Lwt, 95, 361-366.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International journal of food microbiology, 23(3-4), 277-294.
- Barth, M., Hankinson, T., Zhuang, H., and Breidt, F. (2010). Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. In "Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages" (W. H. Sperber and M. P. Doyle, eds.), pp. 135-183. Springer New York.

- Belbahi, A. (2015). Étude et modélisation d'un traitement thermique suivi d'un conditionnement (température, aw et CO₂) pour la maîtrise de la flore fongique d'altération des dattes à humidité intermédiaire (Doctoral dissertation, Montpellier SupAgro).
- Belbahi, A. et al., 2015. Heat Resistances of *Candida Apicola* and *Aspergillus Niger* Spores Isolated From Date Fruit Surface. *Journal of Food Process Engineering*.
- Belguedj, N., Bassi, N., Fadlaoui, S., & Agli, A. (2015). Contribution à l'industrialisation par l'amélioration du processus traditionnel de fabrication de la boisson locale à base de datte «Rob». *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 20(7), 818-829.
- Benallaoua, S., Van, P. N., Meo, M. D., Coulon, J., Dumenil, G., & Bonaly, R. (1990). Recherches sur le mode d'action d'un antifongique non polyénique (désertomycine) produit par une souche de *Streptomyces spectabilis*. *Canadian journal of microbiology*, 36(9), 609-616.
- Ben-Lalli, A. (2010). Étude et modélisation de la désinfestation de la datte : analyse du couplage entre transferts thermiques et mortalité des insectes. Thèse de doctorat, Université des sciences et techniques de Montpellier 2., Montpellier, France.
- Ben-Lalli, A., Méot, J.-M., Collignan, A., and Bohuon, P. (2011). Modelling heat-disinfestation of dried fruits on "biological model" larvae *Ephesiakuehniella* (Zeller). *Food Research International* 44, 156-166.
- Bruno Scala. (2011). Les OGM au secours des agrocarburants ? FUTURA PLANETE. [<https://www.futura-sciences.com/planete/actualites/developpement-durable-ogm-secours-agrocarburants-31657/>]. Consulté le 12/06/2021.

C

- Cai, C., Xu, C., Shan, L., Li, X., Zhou, C., Zhang, W., Ferguson, I., and Chen, K. (2006). Low temperature conditioning reduces postharvest chilling injury in loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology* 41, 252-259.
- Cheikh-Rouhou, S., Baklouti, S., Hadj-Taïeb, N., Besbes, S., Chaabouni, S., Blecker, C., & Attia, H. (2006). Élaboration d'une boisson à partir d'écart de triage de dattes: clarification par traitement enzymatique et microfiltration. *Fruits*, 61(6), 389-399.

Colman, S., Spencer, T., Ghamba, P., and Colman, E. (2012). Isolation and identification of fungal species from dried date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits sold in Maiduguri metropolis. *African Journal of Biotechnology* 11, 12063-12066.

Couvert, O., Augustin, J. C., Huchet, V., Mafart, P., & Thuault, D. (2006). Sym'Previus. La microbiologie prévisionnelle, du laboratoire à l'industrie agroalimentaire= Predictivemicrobiology, from laboratory to food industry. *Sciences Des Aliments*, 26(5), 377-393.

D

Darvishi E, Omid M, Bushehri AAS, Golshani A, Smith ML (2013) The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. *PLoS ONE* 8 (10):e76028.

Da Silva, F. V. M., and Gibbs, P. A. (2009). Principles of thermal processing: pasteurization. In "Engineering aspects of thermal food processing" (S. Ricardo, ed.), pp. 13-49. Taylor & Francis-CRC Press, Boca Raton.

Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S., & Clinquart, A. (2012). Les modèles de microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(3), 369-381.

E

Erkmen, O. (2012). Modified-Atmosphere Storage of Foods. In "Progress in Food Preservation" (R. Bhat, A. K. Alias and G. Paliyath, eds.), pp. 49-64. John Wiley & Sons, Oxford.

European Brewery Convention. *Analytica Microbiologica – EBC*. Fachverlag Hans Carl, 2001

F

Fallik, E. (2004). Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biology and Technology* 32, 125-134.

Free, S.J. (2013). Chapter Two-Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Science Direct*. Vol.81. pages : 33-82

Ferreira Fennesy (1997). *Saccharomyces cerevisiae : importance dans le développement des sociétés humaines. Rôle dans l'industrie agro-alimentaire et en thérapeutique*. -119 p. Thèse: Pharmacie: Paris XI : 1997

G

- George, S., Cenkowski, S., and Muir, W. (2004). A review of drying technologies for the preservation of nutritional compounds in waxy skinned fruit. In "North Central ASAE/CSAE Conf, Winnipeg, Manitoba, Canada", Vol. 2425.
- Girhard, M., Tieves, F., Weber, E., Smit, M. S., & Urlacher, V. B. (2013). Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (4), 1625-1635.
- Giridhar, P., and Reddy, S. (2001). Mycobiota and potential mycotoxins of date fruit. *Journal of food science and technology* 38, 418-420.
- Gournier-Chateau N., Larpent 1.-P, Castellanos M.-L., Larpent 1 (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine Ed. Tee & Doc - Lavoisier, 192 p.
- Gorris L. G. M. and Bennik M. H. J. (1994). Bacteriocins for food preservation, *Int. Z. Lebensm. Technol. Verfahrenstech. (ZFL)*, 45 (11): 65

H

- Hencke, S. (2000). Utilisation alimentaire des levures (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).

K

- Kader, A. A., and Hussein, A. M. (2009). Harvesting and postharvest handling of dates. In "Project on the Development of Sustainable Date Palm Production Systems in the GCC countries of the Arabian Peninsula" (ICARDA, ed.), pp. 15, Aleppo, Syria.
- Karel, M., and Lund, D. B. (2003). Storage at Chilling Temperatures. In "Physical Principles of Food Preservation: Revised and Expanded", Vol. , pp. 129. Marcel Dekker, NEW YORK.

- Kreger-van Rig, N. J. W. (1984). A taxonomic study. *The yeasts*, 584.

L

- Lachance, M. A., Bowles, J. M., Kwon, S., Marinoni, G., Starmer, W. T., & Janzen, D. H. (2001). *Metschnikowialochheadii* and *Metschnikowia drosophilae*, two new yeast species isolated from insects associated with flowers. *Canadian journal of microbiology*, 47(2), 103-109.

Larpent L-P., Larpent-Gourgaud M. (1997). Mémento technique de microbiologie - 3ème édition Ed. Tec & Doc, 1039p

Leblonc. Étude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique.- 235 p. Thèse: Pharmacie: Nancy 1 : 1988 ; n051

Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14, 257-269.

M

Magnet(1997). Contribution à l'étude de l'influence des micro-organismes sur la composition du rhum - 259 p. Thèse: Sciences: La Réunion: 571-1 MAG

Munier, P., 1973. Le palmier dattier-techniques agricoles et productions tropicales. France: Maisonneuve et Larousse, 217p.

P

Price, C. W., Fuson, G. B., & Phaff, H. J. (1978). Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiological reviews*, 42(1), 161.

Q

Quiroz-Villareal,S., Hernández,N.Z., Luna-Romero,I., Amora-Lazcano, E., and RodríguezTorabizadeh, H., Shojaosadati, S.A., Tehrani, H,A,. 1996. Preparation and Characterisation of BioemulsifierFrom *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products. *LWT Food Sci Tech* 29, 734-7c.

R

Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,610–616.

S

Sandhya (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. *LWT-Food Science and Technology* 43, 381-392.

Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R., López-Molina, D., & Marín-Iniesta, F. (2018). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in culture broth and natural orange juice. *Journal of food science and technology*, 55(11), 4623-4633.

Satyanarayana, T., & Kunze, G. (Eds.). (2009). *Yeast biotechnology: diversity and applications* (Vol. 78). Dordrecht: Springer.

Sidhu, J. S. (2006). Date fruits production and processing. In "Handbook of fruits and fruit processing" (Y. H. Hui, ed.), pp. 391. Blackwell Publishing, Ame

Smid, E.J. et Gorris, L. GM (2007). Natural antimicrobials for food preservation. In : *Handbook of food preservation*. CRC Press. p. 255-276.

Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6), 1006-1017

Sukatta U, Haruthaithanasan V, Chantarapanont W, Dilokkunanant U, Suppakul P (2008) Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape in vitro. *Kasetsart J Nat Sci* 42:169–174

V

Vega-Alvarado, L., Gómez-Angulo, J., Escalante-García, Z., Grande, R., Gschaedler-Mathis, A., Amaya-Delgado, L., ... & Arrizon, J. (2015). High-quality draft genome sequence of *Candida apicola* NRRL Y-50540. *Genome announcements*, 3(3), e00437-15.

Vicente, A. R., Martínez, G. A., Civello, P. M., and Chaves, A. R. (2002). Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology* 25, 59-71.

Vigers, A. J., Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. P., (1991). A new family of plant antifungal proteins, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:315.

W

Wilkins K. M., and Board, R. G., (1989). Natural antimicrobial systems, In *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures* (G. W. Gould, Ed.), Elsevier Applied Science, London, p. 285.

ANNEXES

1/ Produits utilisés

- Milieu de culture Sabouraud.
- DMSO
- Eau physiologique stérile
- Eau distillée

2/ Verrerie et autre matériel de laboratoire

- Cellule de Thoma
- -Microscope + lames + lamelles
- Tubes (essai, Eppendorf, en plastique a vis stériles)
- -Pipettes pasteur +Anse de platine
- Micropipettes + embouts stériles
- Béchers
- Boîtes de pétri
- Portoirs
- Bec bunsen
- Papier filtre
- Entonnoir +flacons + toile en gaze
- Balance de paillasse +balance précision
- Plaque chauffante
- Agitateur+ barreau magnétique
- Fiole joggée 500 ml
- Spatule
- Pissette
- Vortex
- Autoclave
- Étuve
- -Microfiltre + seringue

3/ Volume de la cellule de Thoma

La cellule de Thoma possède un grand carré central (1 mm²), ce qui fait que son volume est de 0,1 mm³ (10⁻⁴ ml). Ce grand carré est subdivisé en 16 carrés, eux-mêmes subdivisés en 16 petits carrés. Les petits carrés ont 0,05 mm de côté et une profondeur de 0,1 mm, de sorte que le volume de chaque petit carré est de 0,00025 mm³ (25 x 10⁻⁸ ml). Il est également possible de compter dans les carrés moyens. Chaque carré moyen a 16 petits carreaux de 0,2 mm de côté, et d'un volume de 0,004 mm³ soit 4 x 10⁻⁶ ml.