

**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 : AHMED-MILI Mouna
BELOUADAH Manel
LALAOUI Mounir

Intitulé

**Effet de la température et du pH sur la croissance d'une
levure d'altération d'aliments riches en sucre et à humidité
intermédiaire.**

Soutenu devant le jury composé de:

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

Année universitaire : 2021 /2022

REMERCIEMENT

Avant tout nous remercions "Allah" Tout Puissant de nous avoir donné la santé, la force, la patience et le savoir de Pouvoir poursuivre nos études et de réaliser ce travail.

Nos reconnaissances vont tout d'abord au encadreur le Dr. BELBAHI Amine qui a accepté de nous encadrer et de nous avoir fait confiance pour effectuer ce travail on soutien continu et ses encouragements permanents, de nous avoir dirigées, aidées durant toute la période de notre stage et d'avoir été patient et compréhensif. Qu'ALLAH le récompense et lui permet d'atteindre les plus hauts niveaux dans son parcours professionnel.

Nous remercions infiniment le Dr. AOUN Omar et le Dr. BOUAOUDIA-MADI Nadia pour avoir accepté d'examiner notre travail. C'est un honneur et un immense plaisir de présenter ce travail devant vous.

Un grand merci à M^{me} GHARBI Latifa. Pour nous aider et nous soutenir toute la période de notre stage.

On remercie infiniment les membres du laboratoire de biochimie et Microbiologie qui nous ont soutenu, et grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur.

Nous remercions également tous nos enseignants, sans exception, qui ont illuminé nos cinq années d'études universitaires.

nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

DÉDICACE

À l'aide de "ALLAH", le Tout-Puissant.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail a ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais Jamais à leur exprimer mon amour sincère.

Je dédie ce travail à mes très chers parents Belouadah Ameer et Oumhani Oumkheire je les remercie pour leurs sacrifices, leurs patiences, leur soutien, l'aide et les encouragements qui m'ont apporté durant toutes ces années d'étude sans eux. Je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui.

À mes sœur Mariem et Halima.

À mes frères Zakaria, Zouhir, Ahmed, Mohamed, Anouar, Farouk et Soufiane .

À toute ma famille Belouadah.

Ma grande mère.

Mes chers amis Hanine ; Mouna ; Aarem ; Randa ; Yousra ; Naoual je leur souhaite un bon avenir.

Mon cher binôme Mouna merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble, merci de m'avoir soutenu pendant cette année.

Et à toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.

À tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à ce travail.

Manel

DÉDICACE

Avec gratitude, , je dédie cet humble travail

Pour ceux qui, quels que soient les termes adoptés, ne pouvaient

Je ne leur exprime pas mon amour sincère pour eux.

*À l'homme précieux qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect mon père, décédé
prématurément cher Belkacem.*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, et qui n'a jamais dit non à mes demandes
ma chère maman que Dieu la guérisse.*

*À mes frères qui n'ont cessé de me conseiller, m'encourager et me soutenir tout au long de
mon travail et ma vie. Que "ALLAH" les protège et leur accorde succès et bonheur.*

À tous mes amis et ma famille qui m'ont aimé et soutenu.

Sans oublier mon amie Manel pour son soutien moral

Patience et compréhension tout au long de ce projet.

Mouna

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail

À la source de joie et de bonheur, mes parents.

*À celle que j'aime à tous mon cœur, et qui m'a soutenue et encourager durant mes
études, mon épouse*

*À les anges de ma vie, mes enfants et mes trésors ALAE, AYA, ABDELMOUNAIME. Vous êtes
la chance de ma vie et un amour infini.*

À mes frères et sœurs: Soulef, Fares, Sabrina, Sami, et Hamza.

À tous mes collègues de laboratoires de biologie.

À tous mes amis et qui m'ont aimé.

À vous, je dédie ce modeste travail.

Mounir

RÉSUMÉ

L'objectif de présent travail est d'isoler une levure osmophile et xérophile d'altération des dattes ; d'apprécier l'effet du pH et de la température sur sa cinétique de croissance sur milieu modèle liquide ; déterminer les paramètres cinétiques par la modélisation de la croissance ; et proposer les paramètres limites de développement de pH et de température. Une levure xérophile et osmophile a été isolées à partir du fruit dattier variété *Deglet-nour*. Pour déterminer l'effet du pH et de la température sur la croissance le milieu de Saboraud liquide a été ajusté à différents pH (8, 9, 10 et 11) et incubé à différentes températures (5, 10, 15, 20 et 25°C). La croissance a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la comptage des levures à l'aide d'une microscope optique. Les courbes de croissance obtenue suivent plus au moins une l'allure d'une courbe de croissance classique d'une levure, à l'exception de quelques conditions où la courbe de croissance est incomplète ou les données sont de mauvaises qualité. Deux paramètres sont affectés par l'abaissement de la température, le temps de latence et la vitesse de croissance située au niveau de la phase exponentielle. Le temps de latence est allongé au fur à mesure que la température baisse ou lorsque le pH augmente. Les cinétiques de croissance de la levure ont été bien présentées par le modèle Gompertz. Les paramètres estimés confirme les observations des allures des courbes de croissances. Par exemple, le temps de latence qui est allongé au fur à mesure que la température baisse, il passe de 26,79 h à 13,23 h ; la vitesse de croissance exprimée par la pente de la courbe de croissance au niveau de la phase stationnaire baisse aussi considérablement, elle passe de 1 à 0,013 (h⁻¹). Ces résultats méritent d'être plus exploités pour un objectif de conservation des aliments riches en sucres avec une humidité intermédiaire.

Mots clés: levure xérophile et osmophile ; cinétique de croissance ; pH ; température ; modélisation.

ABSTRACT

The aim of this work is to isolate an osmophilic and xerophilic yeast responsible of date alteration; to assess the effect of pH and temperature on its growth kinetics on liquid model medium; to determine kinetic parameters by modeling growth; and propose the limit parameters of pH and temperature development. A xerophilic and osmophilic yeast was isolated from the date fruit variety *Deglet-nour*. To determine the effect of pH and temperature on growth, liquid Saboraud's medium was adjusted to different pH values (8, 9, 10 and 11) and incubated at different temperatures (5, 10, 15, 20 and 25°C). Growth was estimated by measuring optical density at 600 nm using a spectrophotometer and counting yeast using an optical microscope. The growth curves obtained more or less follow the shape of a classic yeast growth curve, with the exception of a few conditions where the growth curve is incomplete or the data are of poor quality. Two parameters are affected by the lowering of the temperature, the latency time and the growth rate located at the level of the exponential phase. The lag time is lengthened as the temperature drops or as the pH increases. Yeast growth kinetics were well presented by the Gompertz model. The estimated parameters confirm the observations of the growth curves. For example, the latency time, which is extended as the temperature decreases, goes from 26,79 h to 13,23 h; the growth rate expressed by the slope of the growth curve at the level of the stationary phase also decreases considerably, it goes from 1 to 0.013 (h⁻¹). These results deserve to be further exploited for the purpose of preserving foods rich in sugars with intermediate humidity.

Keywords: xerophilic and osmophilic yeast; growth kinetic; pH; temperature; modelling.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل الخميرة المحبة للسكر و الوساط الجافة، و التي تسبب افساد التمور والزيروفيلي؛ و ذلك لتقييم تأثير الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة على حركية نموها اثناء تواجدها في وسط سائل و نموذجي؛ و تحديد المعايير الحركية عن طريق نمذجة النمو؛ و اقتراح المعايير الحدية لتطور الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة. تم عزل هذه الخميرة المحبة للسكر و للجفاف من ثمرة التمور، نوعية دقلة نور. لتحديد تأثير الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة على النمو، تم تعديل وسط سابورو السائل إلى أس هيدروجيني مختلف (8، 9، 10، و 11) واحتضانه في درجات حرارة مختلفة (5، 10، 15، 20، و 25 درجة مئوية). تم تقدير النمو عن طريق قياس الكثافة الضوئية عند 600 نانومتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي وعد الخمائر باستخدام المجهر الضوئي. تتبع منحنيات النمو التي تم الحصول عليها بشكل أو بآخر شكل منحنى نمو الخميرة الكلاسيكي، باستثناء بعض الحالات التي يكون فيها منحنى النمو غير مكتمل أو تكون البيانات ذات جودة رديئة. تأثر معيارين منها بانخفاض درجة الحرارة، ووقت الكمون ومعدل النمو الموجود على مستوى المرحلة الأسية. يتم إطالة فترة التأخير مع انخفاض درجة الحرارة أو زيادة الأس الهيدروجيني. تم عرض حركيات نمو الخميرة بشكل جيد بواسطة نموذج Gompertz. المعايير المتوقعة أكدت ملاحظات منحنيات النمو، و على سبيل المثال زمن الكمون و الذي يطول مع انخفاض درجة الحرارة، فينتقل من 26.79 ساعة إلى 13.23 ساعة؛ و ينخفض أيضاً معدل النمو الذي يعبر عنه منحدر منحنى النمو على مستوى المرحلة الثابتة بشكل كبير، حيث ينتقل من 1 إلى 0.013 (سا⁻¹). تستحق هذه النتائج مزيداً من الاستغلال لغرض الحفاظ على الأطعمة الغنية بالسكريات ذات الرطوبة المتوسطة.

الكلمات المفتاحية: خميرة محبة للسكر و للأوساط الجافة؛ حركية النمو، الأس الهيدروجيني. درجة الحرارة؛ نمذجة.

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. Altération microbienne des aliments	3
1.1. Généralités	3
1.2. Description de l'altération microbiologique	3
2. Microflore fongique d'altération	4
2.1. Moisissures	4
2.2. Levure	5
3. Levure osmophile et xérophile	6
3.1. Cellule levurienne	6
3.2. <i>Candida apicola</i>	7
4. Microbiologie prévisionnelle	7
4.1. Qu'est-ce que la microbiologie prévisionnelle ?	7
4.2. Modèle de croissance	9
5. Facteurs affectant la croissance	12
5.1. Température	13
5.2. pH	14
5.3. Activité de l'eau a_w	14
6. Facteurs affectant la conservation de l'aliment	15
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
1. Lieux de stage	17
2. Matériel biologique	17
3. Préparation de l'inoculum	17

4.	Préparation des milieux à différents pH	18
5.	Inoculation et suivi de la croissance.....	18
	CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	20
1.	Description des levures isolées	20
1.1.	Observation visuelle des colonies.....	20
1.2.	Observation microscopique des cellules.....	20
2.	Effet de température sur la croissance	21
3.	Effet du pH sur la croissance	23
4.	Estimation des paramètres du modèle de croissance	25
	CONCLUSION.....	38
	RÉFÉRENCES.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Plages de températures de développement pour les micro-organismes procaryotes (Silliker, 1980)	13
Tableau 2. Plage de pH microbien pour la croissance (Jay, 2000).	14
Tableau 3. Valeurs minimales d' a_w pour la croissance de quelques micro-organismes représentatifs de l'altération alimentaire (Christian, 2000).....	15
Tableau 4. Paramètres estimés du modèle Gompertz (lignes) décrivant la cinétique de croissance de la levure isolée à 25°C (A), 20°C (B) et 15°C (C).....	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Cellules de levure en bourgeonnement observées au MEB (Castan, 2016)	7
Figure 2. Principales phases d'une courbe de croissance microbienne et paramètres du modèle qui la caractérise.....	10
Figure 3. Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des micro-organismes dans les aliments (Augustin, 1999).....	12
Figure 4. Effet de la température sur la vitesse de croissance (Prescott et al., 2018).....	13
Figure 5. Dispositif expérimental de suivi de la croissance de la levure avec température contrôlée et agitation continue.	18
Figure 6. Photographie du dispositif dans une étuve à 25 °C.	19
Figure 7. Schématisation de la procédure de suivi de la croissance de levure.....	19
Figure 8. Aspect des colonies de levures osmophiles sur milieu OGYA isolée à partir de la datte.	20
Figure 9. Aspect des cellules de levures osmophiles observées au microscope optique (grossissement x 40).....	21
Figure 10. Cinétiques de croissances de la levure isolée à différentes températures d'incubation 5, 10, 15, 20 et 25°C.....	22
Figure 11. Cinétiques de croissances de la levure isolée à différentes pH d'incubation 7 (pH1), 8 (pH2), 9 (pH3), 10 (pH4), 11 (pH5) et à une température de 25°C.	25
Figure 12. Ajustement du Modele de Gompertz (lignes) aux cinétiques de croissance expérimentales (points) à 25°C (A), 20°C (B) et 15°C (C).....	26

INTRODUCTION

Le dernier siècle de progrès de la science et de la technologie alimentaires a conduit à une très forte augmentation du nombre et de la quantité de produits alimentaires disponibles pour les consommateurs. Ces produits sont d'excellents habitats pour le développement microbien, et de nombreux aliments acquièrent un large éventail de micro-organismes contaminants à la suite d'opérations de transformation et de manipulation, mais seule une fraction d'entre eux se développera et finira par dominer l'association de détérioration du produit (Mossel, 1971). L'activité microbienne affecte souvent la qualité et souvent la sécurité des aliments.

Le résultat du processus de sélection et de la succession microbienne est déterminé par le nombre initial et les types de micro-organismes contaminants, et les effets de divers facteurs sur la durée et le taux de la phase de latence où il existe un certain nombre de propriétés nutritionnelles inhérentes ou intrinsèques, telles que l'activité de l'eau, le pH et les composés conservateurs, qui influencent le type et le taux de détérioration bactérienne. Chacune de ces propriétés, bien que présente dans l'aliment à un niveau "normal", peut être manipulée lorsque le produit alimentaire est formulé pour mieux contrôler la qualité et la sécurité alimentaire. (Todd, 1987). Ces facteurs ont été classés en propriétés intrinsèques de l'aliment (pH, a_w , structure...); facteurs extrinsèques (température, atmosphère gazeuse, humidité ...); facteurs de traitement (destruction par la chaleur...); facteurs implicites (taux de croissance spécifique des microorganismes et interactions microbiennes) (McMeekin & Ross, 1996).

Les levures sont constituent un réel problème pour l'industrie alimentaire en particulier en post-récolte des fruits et légumes. Elles sont responsables de la détérioration de plusieurs aliments ; *Candida apicola* est l'une des espèces d'altération des produit riches en sucres avec une humidité intermédiaire, en particulier le fruit dattier et ses dérivés (Belbahi, 2015).

Pour contrôler le développement microbien dans les aliments, plusieurs techniques de de conservation sont utilisées ; les plus courantes consiste à stocker les aliments à basse température, réduire le pH à mesure que la température diminue ou modifier l'activité de l'eau. Ces dernières années, l'intérêt pour le développement de modèles mathématiques décrivant la croissance des micro-organismes s'est accru pour la conservation des aliments. Ces modèles peuvent prédire les changements du nombre de micro-organismes dans un produit au fil du temps, selon l'état physique et chimique du produit (Gould, 1989; Laffont, 2011). Toute solution technologique envisageable pour limiter l'impact de la 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'objectif du présent travail est d'isoler une levure osmophile et xérophile d'altération ; d'apprécier l'effet du pH et de la température sur sa cinétique de croissance sur milieu modèle liquide ; déterminer les paramètres cinétiques par la modélisation de la croissance ; et proposer les paramètres limites de développement de pH et de température.

Chapitre I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Altération microbienne des aliments

1.1. Généralités

La détérioration des aliments se produit lorsque des changements microbiologiques, chimiques ou physiques se produisent, rendant le produit alimentaire inacceptable pour le consommateur. La détérioration microbiologique des aliments est causée par la croissance de micro-organismes qui produisent des enzymes qui conduisent à des sous-produits indésirables dans les aliments. L'altération microbiologique est souvent accompagnée d'une détérioration chimique de l'aliment. Cette dernière se produit lorsque différents composants de l'aliment réagissent entre eux ou avec certains composants ajoutés qui modifient les caractéristiques sensorielles (Benner Jr, 2014). Ce type d'altération peut inclure : l'oxydation des lipides; brunissement enzymatique non enzymatique, dégradation des vitamines... (Joffin J.C., 2003). L'altération physique est également un type important d'altération des aliments ; elle peut être issue de chocs, blessures, changements d'état, variation de la teneur en eau, changement de couleur. Ces opérations provoquant des lésions qui accélèrent les processus d'altérations microbiologiques et biochimiques, notamment le déclenchement du processus de fermentation et le brunissement enzymatique (Ait-Oubahou, 1999).

1.2. Description de l'altération microbologique

L'évolution de la flore d'altération dépend de plusieurs types de facteurs appelés facteurs d'évolution. La croissance des levures et des moisissures est généralement plus lente que celle des bactéries, mais la grande variété de niches écologiques qu'elles peuvent exploiter, la capacité d'utiliser une variété de substrats et la tolérance à des conditions plus extrêmes que les bactéries (végétatives) en font de formidables agents d'altération (Blackburn, 2006).

La flore d'altération est constituée d'une part de la flore naturelle du produit lui-même, qui est principalement influencée par ses conditions environnementales. D'autre part, d'une flore issue d'une contamination croisée pendant ou après le traitement via des surfaces, des machines, des humains ou d'atmosphère environnante. La flore microbienne n'est pas statique, la flore initiale diffère de la flore de l'aliment en fin de vie. De plus, seul un petit nombre de microorganismes est souvent responsable de la perte de qualité en fonction des caractéristiques des aliments, des conditions environnementales et des interactions entre les microorganismes (Kreyenschmidt and Ibal, 2012).

Les nombreux types de microorganismes qui peuvent se développer sur les aliments ont développé des mécanismes biochimiques pour digérer les composants des aliments (protéines, lipides, lactose), fournissant ainsi des sources d'énergie pour leur propre croissance et/ou libérant des composés indésirables (Sperber, 2009). La transformation des composés disponibles donne une large gamme de produits finaux qui affectent les propriétés sensorielles, chimiques et physiques de l'aliment et se traduisent par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (Howell, 2016). L'éventail des composés produits par le microorganisme dépend non seulement de la capacité génétique de celui-ci en question, mais aussi des caractéristiques intrinsèques du produit et des caractéristiques extrinsèques de manipulation et de l'environnement de stockage qui peuvent modifier considérablement les voies biochimiques (Joffin J.C., 2003).

2. Microflore fongique d'altération

La flore fongique regroupe les levures et les moisissures responsables surtout d'altération des produits. Le problème commence par la contamination des aliments, et la multiplication ultérieure de ces micro-organismes indésirables causant la détérioration du produit et entraînant des pertes économiques considérables. En plus d'être un danger pour la santé des consommateurs lorsque des champignons producteurs de mycotoxines sont impliqués (Pitt & Hocking, 2009). Leur identification repose sur l'analyse de critères cultureux (température, vitesse de croissance et milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et al., 1998).

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 (Shenasi et al., 2002). Celles responsables de la détérioration des aliments industriels ont tendance à varier en fonction des particularités du produit alimentaire (par exemple, la composition, les caractéristiques physicochimiques et le traitement auquel il a été soumis) (Snyder et al., 2019).

2.1. Moisissures

Les moisissures sont des microorganismes ubiquistes qui peuvent se développer sur une grande variété de substrats. Les espèces de moisissures les plus fréquentes retrouvées dans les aliments appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ces

moisissures peuvent proliférer et produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, le transport, ou la transformation des matières premières et des aliments (Tabuc, 2007).

La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives). On peut distinguer deux grands types de moisissures :

- a. Les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti* en fromagerie, *P. jensenii* ou *P. nalgiovense* en salaisonnerie.
- b. Les moisissures nuisibles qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits. Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10% des récoltes mondiales (Filtenborg et al., 1996). Par ailleurs, dans des conditions propices de température, humidité, pH, composition de substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques les mycotoxines. Bennett & Klich, (2003) a déclaré que parmi la centaine de mycotoxines identifiées à l'heure actuelle, une trentaine sont véritablement importantes pour la santé humaine et animale à cause de leur fréquence ou de leur toxicité.

2.2. Levure

Les levures comme les moisissures peuvent être trouvées dans une grande variété d'environnements, tels que les plantes, les produits animaux, le sol, l'eau et les insectes. Cette large occurrence peut s'expliquer par le fait que ces espèces peuvent utiliser une variété de substrats tels que les pectines et autres glucides, acides organiques, protéines et lipides. En outre, elles sont relativement tolérantes aux faibles pH, à la faible activité de l'eau, aux basses températures et à la présence de conservateurs (Quiroz-Villareal et Rodríguez, 1996).

Un petit nombre de levures pathogènes sont à signaler, tout spécialement *Candida albicans* responsable du muguet des jeunes enfants, des vaginites, etc. et *Cryptococcus neoformans* disséminé par les pigeons et qui peut provoquer des méningites fatales (J.M, 1995; Koenig, 1995; Odds, 1995). En revanche, les levures des produits alimentaires n'étant pas pathogènes, elles ne causeront pas d'intoxication alimentaire mais peuvent produire par leur développement des altérations de la qualité marchande de ces aliments (Rambaud, 2004). Elles sont souvent mises en cause dans l'altération des aliments et des boissons à teneur en

sucres élevée et à pH bas (Tchango, 1991). Des levures appartenant aux genres *Candida* et *Saccharomyces* ont été isolées des jus d'ananas et des nectars de goyave, de grenadille et de pomelo (Tchango-Tchango et al., 1992). Des espèces appartenant aux genres *Candida*, *Pichia* et *Saccharomyces* sont fréquentes dans les jus d'orange (Efiuvwevwere et Oyelade, 1991). Ces micro-organismes d'altération sont généralement responsables de la mauvaise qualité marchande et des pertes importantes de produits au cours du stockage.

Les facteurs affectant la croissance et la survie, et la capacité pour prédire la réponse de la levure à différents facteurs, sont particulièrement importants aux niveaux pratiques du contrôle et de l'assurance de la qualité. Pour la plupart des levures, les limites de croissance et de survie, ainsi que la cinétique d'inactivation pour les paramètres technologiques de base tels que la température, le pH, la concentration en sucre et la concentration en sel, ne sont pas bien définies et nécessitent une enquête plus minutieuse et systématique (Betts et al., 2000; Praphailong & Fleet, 1997).

La maîtrise de la croissance et de l'activité des levures d'altération nécessite une bonne compréhension de leur physiologie, de leur biochimie et des réponses génétiques. Malheureusement, il reste de grandes lacunes dans ces connaissances, en particulier pour les levures autres que *S. cerevisiae*.

3. Levure osmophile et xérophile

3.1. Cellule levurienne

On appelle levures tous les champignons microscopiques unicellulaires de forme sphérique ou ovoïde se multipliant par bourgeonnement, quelles que soient leur place dans la classification et leurs propriétés fermentaires. Le terme de levure (du latin *levare* = rendre léger) rappelle ses capacités à « faire lever » les pâtes panifiables (Fennesy, 1997).

Les levures, micro-organismes unicellulaires, non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles appartiennent à trois familles : les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes. En œnologie, on les sépare en levures fermentaires capables de réaliser la fermentation alcoolique en partie ou en totalité et en levures oxydatives, non-fermentaires. On peut les classer aussi en levures *Saccharomyces* et en non-*Saccharomyces* (Diguta, 2010).

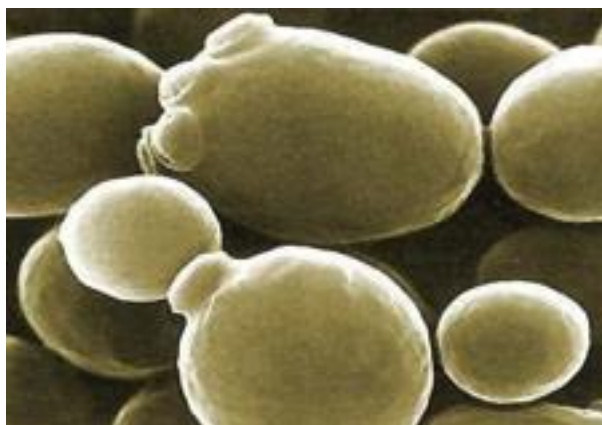


Figure 1. Cellules de levure en bourgeonnement observées au MEB (Castan, 2016)

3.2. *Candida apicola*

Les espèces de *Candida* représentent un quart de toutes les levures connues et leur hétérogénéité signifie qu'ils sont responsables de la détérioration d'un large éventail d'aliments (Blackburn, 2006). *Candida apicola* appartient à une catégorie de levures qui produisent de grandes quantités de glycolipides extracellulaires actifs. Elle est capable d'altérer des produits riches en sucre et à faible en aw tel que la dattes et ses dérivés (Girhard et al., 2013). Naturellement, cette levure a été trouvée dans les processus de fermentation du vin et de la Cachaça ; elle présente la capacité de produire des composés volatils (Arrizon et al., 2012; Kuki et al., 2011).

Lorsqu'elle est cultivée en laboratoire, *C. apicola* apparaît sous forme de grandes colonies rondes, blanches ou crème. Elle est hautement osmotolérante, produit des sphorolipides (biosurfactants), des acides gras membranaires et des enzymes telles que des réductases et des protéases (Bednarski et al., 2004; Reid et al., 2012).

Jusqu'à présent, seule la *Saccharomyces cerevisiae* a été considérée dans le cadre de son application dans le domaine de l'industrie car elle dispose d'informations plus précises, et est une espèce disponible comme source alimentaire. Par ailleurs, *Candida apicola* est une levure à fort potentiel industriel ; elle utilisée dans la synthèse dans de nombreux composés particulièrement des mannoprotéines.

4. Microbiologie prévisionnelle

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

La microbiologie prédictive est un sujet d'intérêt croissant, qui vise à prévoir le développement des micro-organismes dans les aliments à l'aide de modélisations

mathématiques. 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) :

- a. Détermination des dates limites de consommation (DLC) : notion de dose minimale infectieuse (DMI).
- b. Prédiction de la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altérations sur un aliment déterminé.
- c. Optimisation de procédés et les adapter afin de garantir la sécurité de l'aliment : traitements thermiques, conditions de conservation...
- d. 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).
- e. Aide au développement de nouveaux produits : formulation et procédé.
- f. Détermination des limites critiques des facteurs environnementaux. Exemple: détermination des points critiques microbiologiques (HACCP).

Les détracteurs du concept de modélisation prédictive continuent de pointer du doigt les obstacles à son application pratique (par exemple Gill, 1986 ; Hedges, 1991 ; Riemann, 1992), notamment :

- a. la nécessité et la difficulté de mesurer l'état microbiologique initial des le produit, à la fois en termes de nombre et de types de micro-organismes et de leur temps de latence sur le produit ;
- b. la complexité des systèmes alimentaires en termes d'hétérogénéité dans leur composition, les organismes présents et leurs interactions possibles.
- c. la contribution des facteurs non microbiens à la détérioration du produit.
- d. développement de modèles mathématiques appropriés pour définir les réponses aux facteurs environnementaux.
- e. L'importance de la variabilité biologique et la probabilité de réponses cohérentes, en particulier dans des conditions de stress.
- f. l'effet de facteurs extrinsèques fluctuants.
- g. développement de technologies pour surveiller les facteurs extrinsèques et interpréter leurs Effets sur la qualité du produit.

4.2. Modèle de croissance

En microbiologie alimentaire prédictive, une courbe de croissance bactérienne est souvent caractérisée par deux paramètres, le temps de latence et le temps de génération. Ils sont généralement estimés à partir de la cinétique de croissance expérimentale par l'ajustement d'un modèle de niveau primaire, tel que l'équation modifiée de Gompertz (Gibson et al., 1988; Zwietering et al., 1990) ou le modèle proposé par Baranyi et Roberts, (1994). Des modèles de niveau secondaire sont ensuite développés pour décrire l'effet de certaines conditions environnementales, telles que la température et le pH, sur ces paramètres de croissance. A cette fin, deux types de modèles sont principalement utilisés, les modèles de type polynôme (Roberts, 1995) et les modèles de type racine carrée (Zwietering et al., 1992).

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 2). Ces phases sont (Monod, 1942; Penfold, 1914; Winslow & Walker, 1939):

- a. Phases de latence (λ) où la population initiale ($N(0)$) est constante et la vitesse de croissance (μ) est nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l' inoculum.
- b. Phase d'accélération où $\mu > 0$; la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale. Cette phase est considérée par certains auteurs comme faisant partie de la phase de latence .
- c. Phase exponentielle où la vitesse de croissance atteint son niveau maximum (μ_{\max}) . Elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture.
- 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}). Qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des micro-organismes.

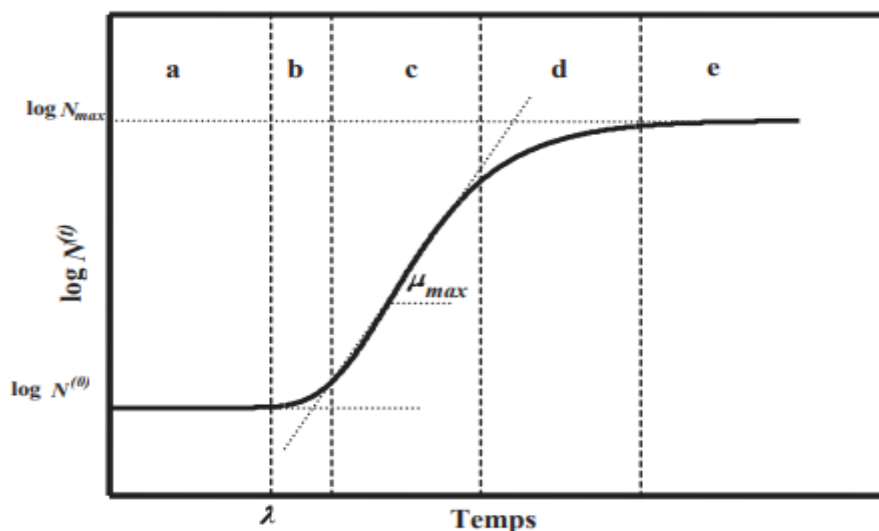


Figure 2. Principales phases d'une courbe de croissance microbienne et paramètres du modèle qui la caractérise.

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 de Zwietering *et al.* (1990), Rosso (1995) et 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 :

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 de Baranyi 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. Facteurs affectant la croissance

La croissance est gouvernée par les conditions de stockage (facteurs extrinsèques) et par les caractéristiques propres au produit (facteurs intrinsèques). Ces deux types de facteurs sont repris sous le terme général de facteurs environnementaux. Dans les aliments, les facteurs environnementaux sont souvent complexes et dynamiques car ils doivent inclure l'effet combiné de facteurs extrinsèques comme la température, la composition en gaz de l'atmosphère de conditionnement et les facteurs intrinsèques comme le pH, l'activité de l'eau, la présence naturelle de certains acides et les interactions entre les groupes de microorganismes. Les modèles secondaires permettent de décrire l'effet des conditions environnementales sur les paramètres du modèle primaire (Delhalle et al., 2012).

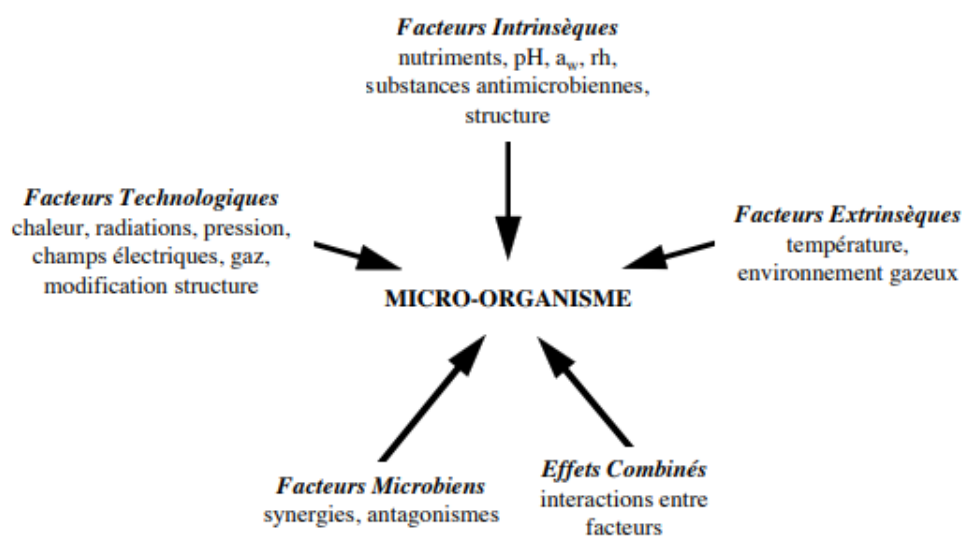


Figure 3. Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des micro-organismes dans les aliments (Augustin, 1999).

La croissance des levures et des moisissures est généralement plus lente que celle des bactéries, mais la grande variété de niches écologiques qu'elles peuvent exploiter, la capacité à utiliser un variété de substrats et la tolérance à des conditions plus extrêmes que les bactéries (végétatives) en font de redoutables agents de détérioration (Bevilacqua et al., 2016).

5.1. Température

Dans la plupart des situations, la température est le facteur environnemental qui aura le plus d'impact sur la croissance des micro-organismes dans les aliments. Durant les étapes de transformation, de stockage et de distribution, la température des aliments peut varier considérablement et inclure des périodes d'abus de température (Likar & Jevšnik, 2006).

Tableau 1. Plages de températures de développement pour les micro-organismes procaryotes (Silliker, 1980)

Groupe	Temperature (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum
Thermophiles	40 - 45	55- 75	60 - 90
Mésophiles	5 - 15	30- 45	35- 47
Psychrophiles (psychrophiles obligatoires)	-5 - +5	12-15	15-20
Psychrotrophes (psychrophiles facultatifs)	-5 - +5	25-30	30-35

Le suivi des températures à différentes étapes de la chaîne alimentaire permet d'introduire ces données dans un modèle secondaire intégrant l'effet de la température au cours du temps, afin de prédire les conséquences en termes de croissance. Le modèle secondaire le plus utilisé et le plus descriptif est le modèle de cardinale avec inflexion (MCI) ; il décrit l'effet de la température sur la croissance des microorganismes par trois paramètres cardinaux qui sont T_{\min} , T_{opt} et T_{\max} (Figure 4).

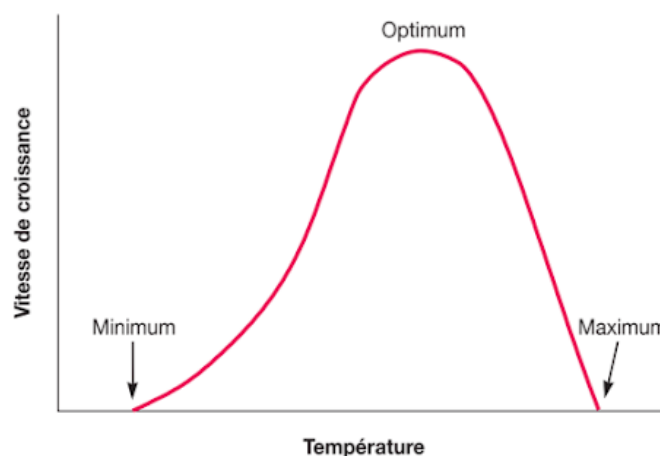


Figure 4. Effet de la température sur la vitesse de croissance (Prescott et al., 2018).

La température n'est pas un facteur déclenchant comme l'eau. Ce paramètre influe uniquement sur la vitesse de croissance des moisissures. La plupart des champignons se développant sur les collections sont mésophiles ; c'est-à-dire qu'ils se développent autour de

20-25°C (température qui correspond à la moyenne habituelle des locaux de conservation). Une température inférieure à 20°C commence à ralentir la vitesse de croissance et à 0°C les réactions biochimiques sont presque toutes arrêtées. Cependant, le maintien d'une température négative, même si elle arrête la croissance et peut détruire les formes végétatives, n'éradique pas une contamination (Laffont, 2011).

5.2. pH

La valeur du pH des aliments est une autre valeur intrinsèque importante qui détermine quels types de micro-organismes peuvent gâcher un aliment. Puisque le pH est une fonction logarithmique, doubler ou réduire de moitié le $[H^+]$ modifiera la valeur du pH d'un substrat de 0,3 unité ($\log(2) = 0,3$). Cela signifie que lorsque l'acidité d'un système augmente, la valeur du pH diminue. Certains micro-organismes ont développé des réponses élaborées de tolérance aux acides pour faire face à des environnements à pH réduit (Sperber, 2009). En général, de nombreux micro-organismes de détérioration d'origine alimentaire peuvent se développer sur la majeure partie de la plage de pH, de 0,5 à 11,0 (Tableau 2). La plupart des bactéries d'origine alimentaire peuvent se développer dans la plage de pH de 4,5 à 9,0. La plupart des aliments ont un pH allant de légèrement acide à fortement acide (Jay, 2000).

Tableau 2. Plage de pH microbien pour la croissance (Jay, 2000).

Micro-organisme	pH minimal	pH maximal
Moisissures	0,5	11
Levures	1,5	8,5
Alicyclobacilles	2	6
Bactéries lactiques	3,5	9
Bactéries entériques	4,5	9

5.3. Activité de l'eau a_w

La détermination de la valeur de l'activité de l'eau d'un aliment a remplacé la détermination du pourcentage d'humidité comme moyen le plus précis pour déterminer le potentiel de croissance des micro-organismes. Une partie de l'eau présente dans les aliments est liée chimiquement par des liaisons hydrogène, par les molécules alimentaires constitutives et par des solutés ajoutés. La valeur a_w indique la proportion d'humidité de l'aliment qui est physiquement disponible pour la croissance microbienne (Deak, 1996 ; Sperber, 1983).

Tableau 3. Valeurs minimales d' a_w pour la croissance de quelques micro-organismes représentatifs de l'altération alimentaire (Christian, 2000).

	Micro-organisme	a_w minimum pour la croissance
Levures	d'altération	0,90
	osmophiles	0,60
	Saccharomyces cerevisiae	0,92
Moisissures	Xérotrophes	0,62
	Altération	0,84
Bactéries	Lactiques	0,92
	Entériques	0,95
	Pseudomonades	0,97
	Bacillus subtilis	0,90
	Alicyclobacilles	0,97

6. Facteurs affectant la conservation de l'aliment

Les facteurs affectant la qualité et la durée de conservation du produit Pour de nombreux aliments, la durée de vie du produit est limitée par des attributs spécifiques ou clés qui peuvent être prédits au moment du développement du produit. On peut classer les facteurs d'altération des aliments selon leur caractère intrinsèque ou extrinsèque (Bourgeois et al., 1988). Les premiers sont relatifs à l'aliment et les seconds proviennent de l'environnement. Les facteurs intrinsèques sont relatifs à l'aliment et sont les propriétés résultant de la composition du produit final et comprennent les éléments tels que l' a_w , pH, type de microflore naturelle et présence d'agents antimicrobiens naturels, conservateurs ajoutés (par exemple sel , épices , antioxydants), etc. Les Facteurs extrinsèques sont le résultat de l'environnement que le produit rencontre au cours de sa vie et comprennent les éléments tels que le profil temps-température de traitement ;humidité relative (stockage et distribution), exposition à la lumière (UV et IR) et composition de l'atmosphère gazeuse (ex. emballages).

Deux facteurs sont à prendre en compte pour expliquer l'effet de la température en plus de son action directe sur le taux de croissance : la température de stockage influence le coefficient de respiration du produit et par conséquent les changements de l'atmosphère gazeuse dans l'emballage, qui peut jouer sur le comportement des microorganismes ; la température peut également influencer le degré de vieillissement des fruits et légumes emballés et par conséquent modifier l'environnement des microorganismes (Desbordes, 2003).

La stabilité du produit dans des emballages de type sachets scellés (atmosphère modifiée) est améliorée, car la croissance des bactéries mésophiles est réduite en raison de la diminution

O₂ et l'augmentation du taux de CO₂ dans l'emballage. Les moisissures qui sont des microorganismes aérobies sont très susceptibles par ce type de conditionnement (Blackburn, 2006). En revanche, la croissance des levures n'est pas affectée par des atmosphères modifiées et peut déclenché son métabolisme fermentaire et dégrader ainsi le produit et l'emballage.

Chapitre II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Lieux de stage

Ce présent travail a été effectué entièrement au niveau des laboratoires pédagogiques du département de Microbiologie et de Biochimie de l'université de M'sila. Un seul essai sur lecteur microplaque a été effectué au niveau du laboratoire BBBS de l'université de Béjaia.

2. 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.

3. Préparation de l'inoculum

Les colonies de levures sont transférées dans un milieu Sabouraud à partir d'une boîte des boîtes de OGYA supplémenté de 20 % bs de saccharose et incubées à 25°C. Une ou deux colonies sont récupérées à partir de ces boîtes et ensemencées dans tubes contenant du Sabouraud liquide (Sabouraud Broth) stérile puis homogénéisé au vortex. Cette suspension de levure est appelée suspension brute.

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 numération est réalisée sous microscope en champ clair avec un objectif de grossissement x 40. La cellule de comptage a un volume défini et est subdivisée en carrés à la surface. Un nombre moyen C de cellules comptées dans cinq carrés de 0,2 mm de côté est estimé. Le nombre de cellule C dans un échantillon exprimé en cellules/ml est (EBC, 2001) :

$$C = C \times 0,25 \times 10^6 \times f$$

Avec f étant facteur de dilution.

Une concentration C2 de la solution mère SM d'environ 8 log est préparée à partir de la suspension brute contenant une concentration C1, estimée comme indiqué précédemment. SM est préparée en réalisant une dilution par ajout de milieu Sabouraud liquide à un volume

V1 de la suspension brute pour obtenir un volume V2. Ce dernier est calculé en utilisant la formule suivante :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

4. Préparation des milieux à différents pH

Le bouillon Sabouraud a été ajusté à différents pH par mélange de deux solutions. La solution A et la solution B contenaient respectivement 0,1 mol/l d'acide citrique (c'est-à-dire 21,0 g/l d'eau distillée) et 0,2 mol/l de Na_2HPO_4 (c'est-à-dire 28,4 g/l d'eau distillée). Le pH a encore été ajusté avec de l'acide citrique ou du Na_2HPO_4 avec de différentes proportions. Pour un pH supérieur à 8, 0,025 mol/l de borate de sodium (c'est-à-dire 9,53 g/l d'eau distillée) ont été utilisés. Le pH a encore été ajusté avec des solutions normales de HCl ou de NaOH. Les solutions de Sabouraud Broth et les réactifs ont été autoclavés séparément et mélangées aseptiquement par la suite. Toutes les solutions de pH ont été contrôlées après autoclavage.

5. Inoculation et suivi de la croissance

Un millilitre de la suspension mère à environ 8 log/ml a été ajouté à 399 ml de milieu Sabouraud liquide dans de petits flacons de 500 ml contenant un barreau aimanté stérile ; milieu seul et milieux avec pH modifiés. Les flacons sont fermés à l'aide d'un septum et pour faire sortir la pression et introduire de l'air un cône contenant un filtre stérile (couvert par du papier aluminium) a été introduit dans le septum.

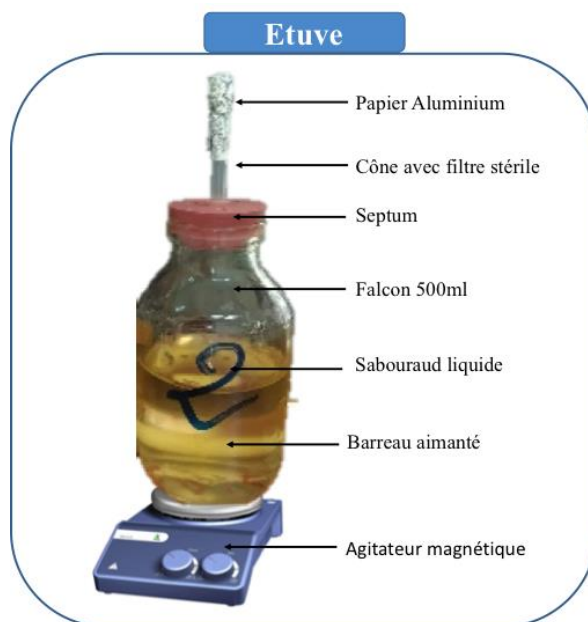


Figure 5. Dispositif expérimental de suivi de la croissance de la levure avec température contrôlée et agitation continue.

Par la suite, les flacons sont posés sur une plaque agitatrice multipostes et le tout est introduit dans une étuve à température contrôlée. Des flacons à différents pH sont incubés à

25°C pour étudier l'effet pH. Des flacons avec milieu Sabouraud liquide seul inoculé sont incubés à 5, 10, 15, 20 et 25°C pour étudier l'effet de la température.



Figure 6. Photographie du dispositif dans une étuve à 25 °C.

Pour suivre l'évolution de la concentration des levures, 0,5 ml sont prélevés des flacons introduit dans une microcuve pour lire la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (Référence) à 600 nm. La concentration des cellules a été estimée également en utilisant la cellule de Thoma.

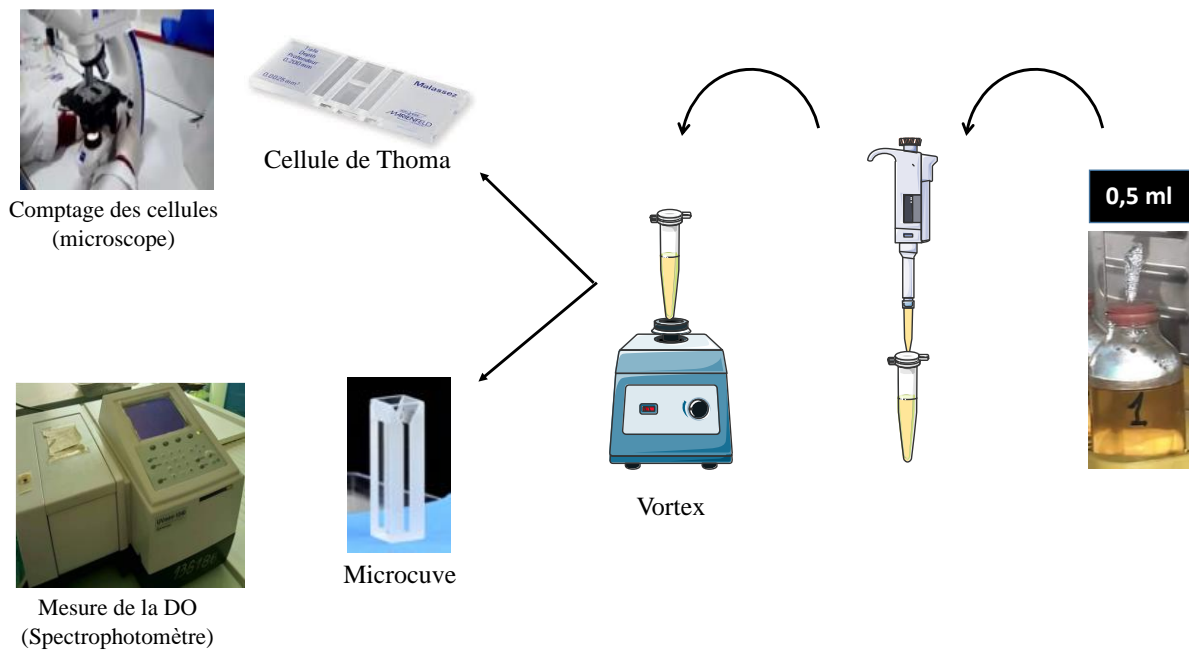


Figure 7. Schématisation de la procédure de suivi de la croissance de levure.

Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Description des levures isolées

1.1. Observation visuelle des colonies

Après cinq jours de croissance sur milieu OGYA supplémenté de 20 % bs de saccharose, la charge des levures osmophiles a été estimée à $0.6 \pm 0.2 \cdot 10^2$ UFC/g de datte. L'observation macroscopique et l'aspect des colonies de levures osmophiles isolées ont permis d'effectuer une caractérisation suivants : les colonies ont une forme sphérique, d'une taille plus ou moins importante ; elle ont un aspect lisse légèrement bombé de côté recto, sur la face verso les colonies sont blanches, plates et lisses avec une couleur blanche à crème. En effet les levures du genre *Candida* ne contient pas de caroténoïde, qui ce qui donne l'impression qu'il est blanc à crème (Suhartatik et al., 2018).



Figure 8. Aspect des colonies de levures osmophiles sur milieu OGYA isolée à partir de la datte.

1.2. 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 8). 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).

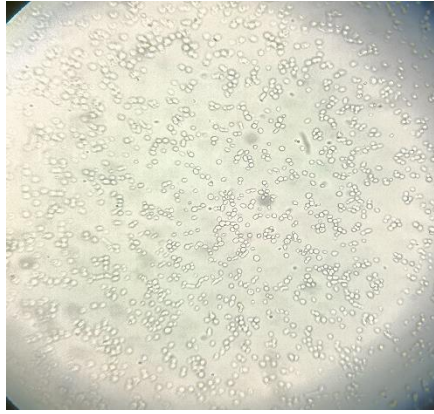


Figure 9. Aspect des cellules de levures osmophiles observées au microscope optique (grossissement x 40).

2. Effet de température sur la croissance

Les cinétiques de croissance décrite par l'augmentation de la densité optiques de la suspension de la levure isolée en fonction du temps sont présentée dans la figure 10. Ces courbes de croissance suivent plus au moins une courbe de croissance classique d'une levure, à l'exception de la courbe de croissance à 10°C ou qui n'est pas complète (phase stationnaire est absente). Deux paramètres sont affectés par l'abaissement de la température, le temps de latence et la vitesse de croissance située au niveau de la phase exponentielle. Le temps de latence est allongé au fur à mesure que la température baisse ; il passe de 20 heures pour une incubation à 25°C à environ 400 heures pour une croissance à 5°C. Cependant la vitesse de croissance exprimée par la pente de la courbe de croissance au niveau de la phase stationnaire baisse considérable de 20 à 5°C.

D'après Laffont (2011), la température n'est pas un facteur déclenchant comme l'eau. Ce paramètre influe uniquement sur la vitesse de croissance des moisissures. La plupart des champignons se développant sur les collections sont mésophiles ; c'est-à-dire qu'ils se développent autour de 20-25°C (température qui correspond à la moyenne habituelle des locaux de conservation). Une température inférieure à 20°C commence à ralentir la vitesse de croissance et à 0°C les réactions biochimiques sont presque toutes arrêtées.

Pendant phase de latence, les bactéries s'adaptent aux conditions de croissance, et c'est la période pendant laquelle les bactéries mûrissent mais n'ont pas encore la capacité de se diviser. C'est aussi lié à la quantité de travail que la levure doit faire pour s'adapter au nouvel environnement. Contrairement à l'étape d'accélération (phase exponentielle), qui est l'étape au cours de laquelle la division cellulaire commence. Cette étape dépend de la consommation de

nutriments tels que les sucres, pour démarrer la fermentation et la production de gaz. Sa durée diminue en fonction de la nature de la levure mésophile et de sa capacité à se multiplier rapidement, notamment avec la disponibilité de l'eau. La température est un facteur majeur dans l'augmentation du taux de reproduction (directement lié à la pente de la courbe), l'augmentation était perceptible à des températures de 10, 15 et 20 °C, avec une diminution d'intensité et de durée à des températures de 5 et 25 °C.

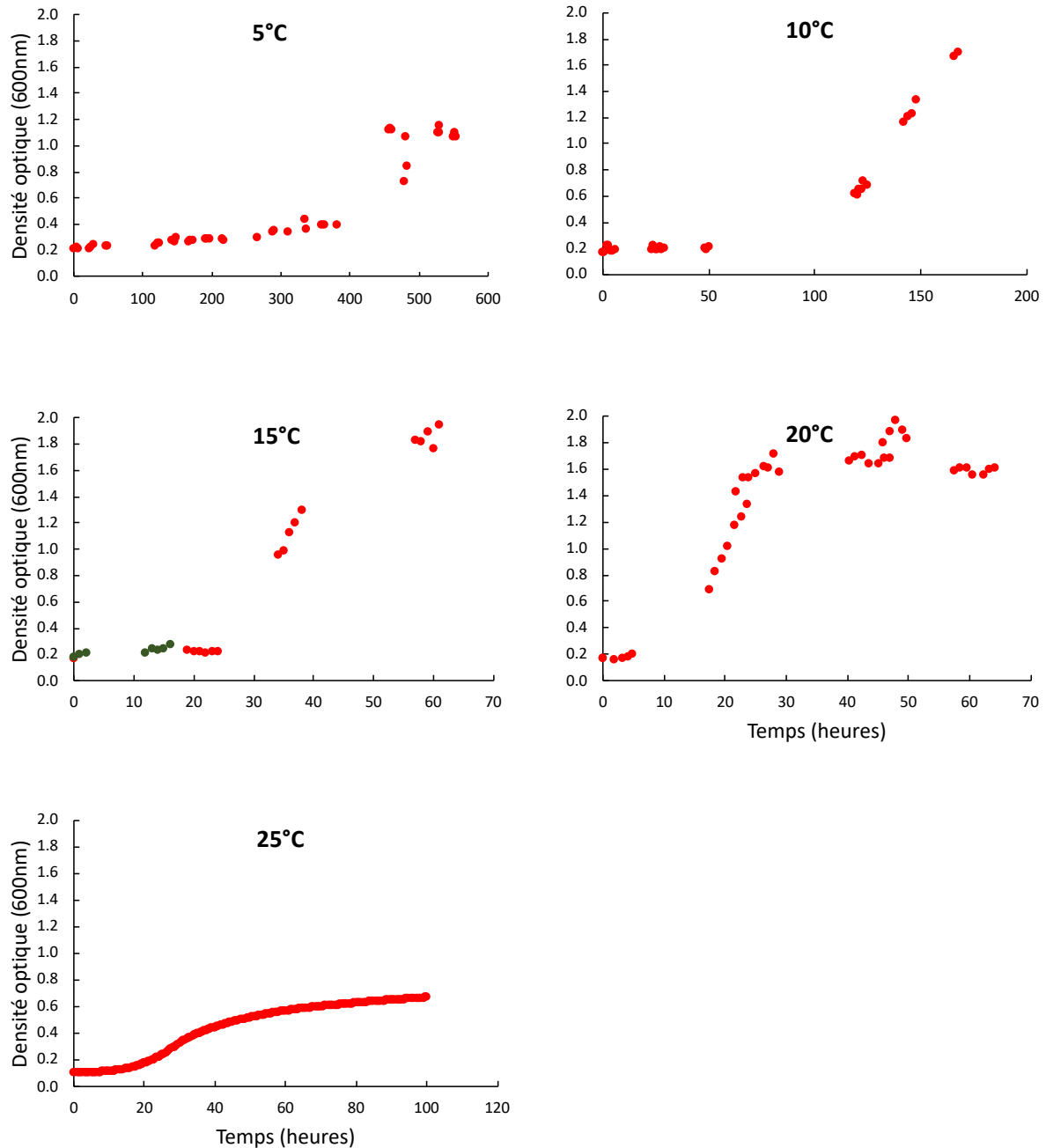


Figure 10. Cinétiques de croissances de la levure isolée à différentes températures d'incubation 5, 10, 15, 20 et 25°C.

La phase de décélération (phase de croissance diminuée) est liée à la sensibilité de la levure aux carences en nutriments et à la baisse du taux de sucre, d'autant que sa durée augmente significativement aux températures 10, 15 et 25°C. La phase stationnaire est caractérisée par un manque de nutriments essentiels ainsi qu'à la formation de produits qui inhibent la croissance tels que la production d'acides organiques et de gaz modifiant les conditions du milieu et le rendre inadapté.

3. Effet du pH sur la croissance

Seule les cinétiques de croissance à des $\text{pH} > 7$ seront discutés dans cette partie. En effet, les cultures à des $\text{pH} < 7$ ont été contaminés et le cinétiques de croissance dans ces conditions ont été arrêtées en l'occurrence les courbes de croissance dans ces conditions ne seront pas présentés. À des $\text{pH} > 7$, les cinétiques de croissance décrite par l'augmentation de la densité optiques de la suspension de la levure isolée en fonction du temps sont présentées dans la figure 11. Ces courbes de croissance ne suivent pas clairement l'allure une courbe de croissance classique d'une levure, à l'exception de la courbe de croissance $\text{pH}2$, $\text{pH}3$ et $\text{pH}5$ ° mais avec une allure incomplète complète (phase stationnaire est absente). Cela peut être expliqué par la qualité des données DO recueillies qui sont assez médiocres ; le fait que les erreurs des points expérimentaux sont assez importants à un niveau où les courbes sont déformées.

Il est connu que les paramètres sont affectés par l'abaissement ou l'augmentation du pH de part et d'autre le pH optimal de croissance. Ces paramètres sont le temps de latence et la vitesse de croissance située au niveau de la phase exponentielle. Le temps de latence est allongé au fur à mesure que l'abaissement ou l'augmentation du pH. Cependant la vitesse de croissance exprimée par la pente de la courbe de croissance au niveau de la phase stationnaire baisse considérablement à des $\text{pH} > 7$ comparativement à la courbe de croissance à 25°C de la figure 10 ; considéré comme courbe de croissance dans des conditions optimales (sans modification de pH).

En effet, l'acidité est fonction de la concentration en ions hydrogène $[\text{H}^+]$ et se mesure en pH. Un pH extrême affecte la structure de toutes les macromolécules. Les liaisons hydrogène qui maintiennent ensemble les brins d'ADN se rompent à un pH élevé. Les lipides sont hydrolysés par un pH extrêmement basique. La force motrice du proton responsable de la production d'ATP dans la respiration cellulaire dépend du gradient de concentration de H^+ à travers la membrane plasmique. Si les ions H^+ sont neutralisés par des ions hydroxyde, le gradient de concentration s'effondre et altère la production d'énergie. Mais le composant le

plus sensible au pH dans la cellule est la protéine ; des changements modérés de pH modifient l'ionisation des groupes fonctionnels de ses acides aminés et perturbent la liaison hydrogène, qui, à son tour, favorise les changements dans le repliement de la molécule, favorisant la dénaturation et l'activité destructrice.

La valeur du pH d'un aliment limite la gamme d'organismes qu'il peut supporter (Modi, 2009). La plupart des micro-organismes se développent autour d'un pH neutre, qui correspond au pH du cytoplasme bactérien et est optimal pour les activités enzymatiques bactériennes (Baron et Gautier, 2016). Cependant, certaines bactéries peuvent tolérer un pH en dehors de ces plages (Davidson et Critzer, 2012).

Les levures présentent une meilleure croissance dans la plage de pH 4,5-7,0. L'extrémité inférieure de l'échelle de pH est préférée par de nombreuses espèces de levures, et de nombreuses espèces poussent facilement à des pH autour de 2,0 (Modi, 2009). Une croissance plus forte des levures à faible pH signifie qu'elles réussissent à concurrencer et à dominer d'autres partenaires microbiens, y compris les bactéries (Howell, 2016). Certaines enzymes levuriennes décomposent les sucres en alcool et en dioxyde de carbone pendant le processus de fermentation dans une gamme de pH allant de 1,5 à 8,5. (Davidson et Critzer, 2012).

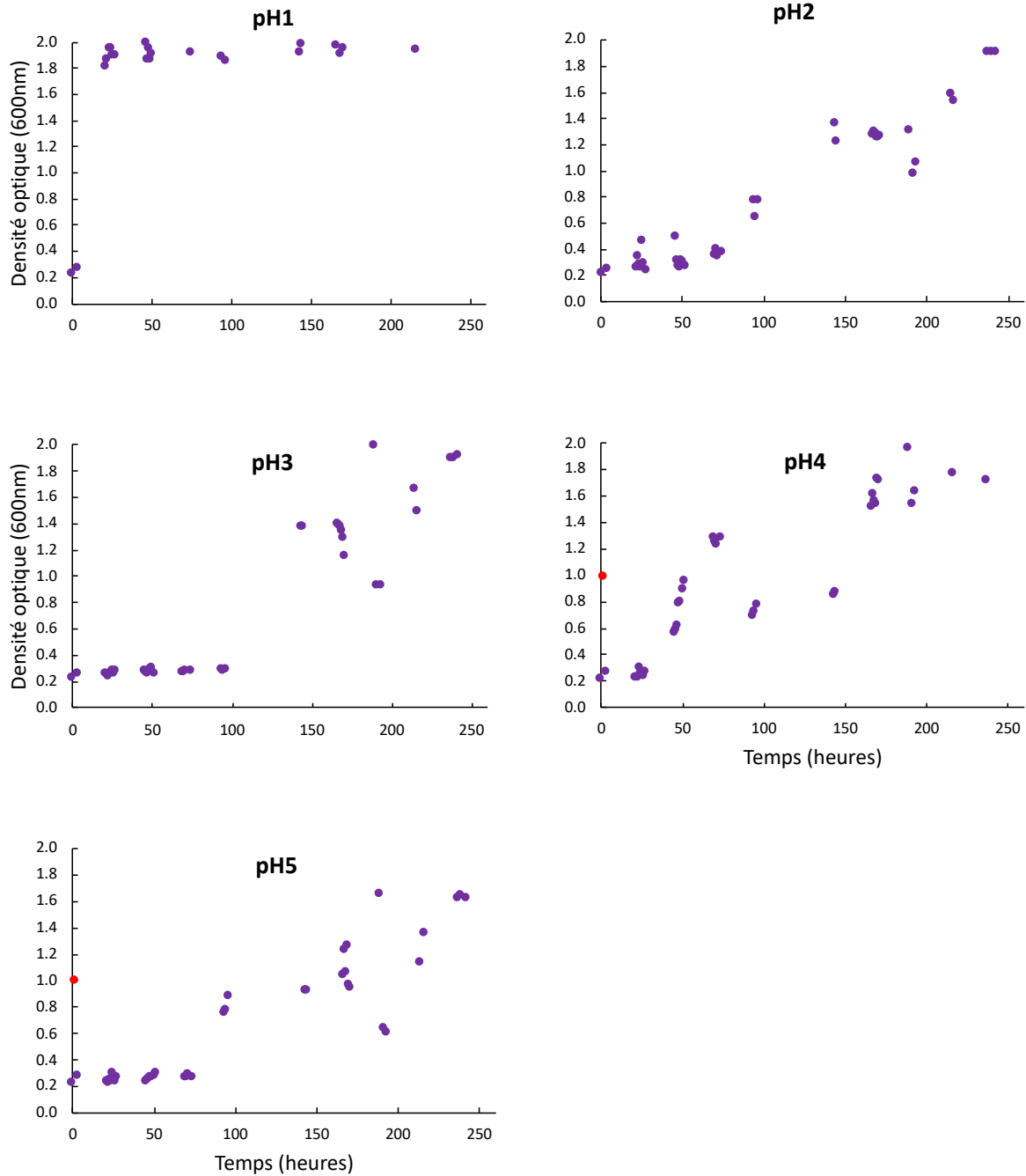


Figure 11. Cinétiques de croissances de la levure isolée à différents pH d'incubation 7 (pH1), 8 (pH2), 9 (pH3), 10 (pH4), 11 (pH5) et à une température de 25°C.

4. Estimation des paramètres du modèle de croissance

Seule les cinétiques de croissance avec des courbes de qualité ont été modélisées ; données expérimentales de DO à 25°C , 20°C et 15°C. La figure 12 présente la cinétique de croissance expérimentale et les valeurs prédites obtenues en optimisant le paramètre du modèle.

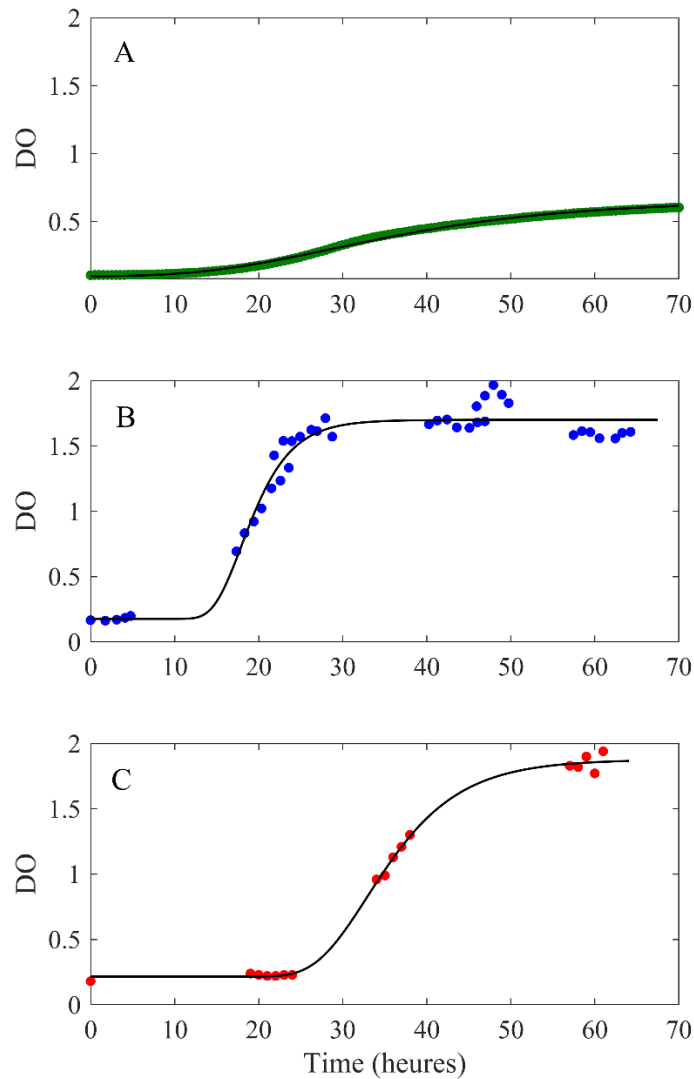


Figure 12. Ajustement du Modèle de Gompertz (lignes) aux cinétiques de croissance expérimentales (points) à 25°C (A), 20°C (B) et 15°C (C).

Les paramètres estimés du modèle Gompertz sont présentés dans le tableau 4. La cinétique de croissance de la levure isolée a été bien représentée par le modèle de Gompertz avec des RMSE < 0.1, ce qui signifie que l'erreur moyenne entre les valeurs expérimentales et prédites des DO est inférieure à 0,1. Les paramètres estimés confirment les observations des allures des courbes de croissances. En effet, le temps de latence qui est allongé au fur à mesure que la température baisse (26.79 ± 5.20 à 13.23 ± 3.30 h) et la vitesse de croissance exprimée par la pente de la courbe de croissance au niveau de la phase stationnaire baisse aussi considérablement, elle passe de 1.000 ± 0.054 à 0.013 ± 0.006 (h^{-1}).

Tableau 4. Paramètres estimés du modèle Gompertz (lignes) décrivant la cinétique de croissance de la levure isolée à 25°C (A), 20°C (B) et 15°C (C).

<i>T</i> (°C)	<i>DO</i> ⁽⁰⁾	<i>a</i>	λ (h)	μ_{\max} (h ⁻¹)	<i>R</i> ²	<i>RMSE</i>
25°C	0.22 ± 0.08	1.67 ± 0.14	26.79 ± 5.20	1.000 ± 0.054	0.997	0.041
20°C	0.18 ± 0.17	1.52 ± 0.19	14.63 ± 7.00	0.169 ± 0.090	0.969	0.103
15°C	0.10 ± 0.01	0.56 ± 0.11	13.23 ± 3.30	0.013 ± 0.006	0.997	0.011

CONCLUSION

Une levure xérophile et osmophile a été isolées à partir du fruit dattier variété *Deglet-nour*. Pour déterminer l'effet du pH et de la température sur la croissance le milieu de Sabraud liquide a été ajusté à différents pH (8, 9, 10 et 11) et incubé à différentes températures (5, 10, 15, 20 et 25°C). La croissance a été estimée en mesurant la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la comptage des levures à l'aide d'une microscope optique. Les courbes de croissance obtenue suivent plus au moins une l'allure d'une courbe de croissance classique d'une levure, à l'exception de quelques conditions où la courbe de croissance est incomplète ou les données sont de mauvaises qualité. Deux paramètres sont affectés par l'abaissement de la température, le temps de latence et la vitesse de croissance située au niveau de la phase exponentielle. Le temps de latence est allongé au fur à mesure que la température baisse ou lorsque le pH augmente. Les cinétiques de croissance de la levure ont été bien présentées par le modèle Gompertz. Les paramètres estimés confirme les observations des allures des courbes de croissances. Par exemple, le temps de latence qui est allongé au fur à mesure que la température baisse, il passe de 26.79 h à 13.23 h ; la vitesse de croissance exprimée par la pente de la courbe de croissance au niveau de la phase stationnaire baisse aussi considérablement, elle passe de 1 à 0.013 (h⁻¹). Ces résultats méritent d'être plus exploités pour un objectif de conservation des aliments riches en sucres avec une humidité intermédiaire.

REFERENCES

A

- Ait-Oubahou, A. (1999). Postharvest handling of dates. *Postharv. New Info*, 10, 67N-74N.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource technology*, 110, 560-565.
- Augustin, J.-C. (1999). *Modélisation de la dynamique de croissance des populations de Listeria monocytogenes dans les aliments* Lyon 1].

B

- 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* Montpellier SupAgro].
- Baron, F., Gautier, M., 2016. Microbial spoilage. In: Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brule, G. (Eds.), *Handbook of Food Science and Technology 1: Food Alteration and Food Quality*. Wiley, New York, NY, pp. 55—97.
- Benner Jr, R. (2014). Organisms of concern but not foodborne or confirmed foodborne: Spoilage microorganisms.
- Blackburn, C. d. W. (2006). Introduction. *Food Spoilage Microorganisms*.
- Bennett, J., & Klich, M. (2003). chotoxins. *C lin. Microbiol. Rev*, 16, 497-516.
- Betts, G., Linton, P., & Betteridge, R. (2000). Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note. *Food microbiology*, 17(1), 47-52.
- Blackburn, C. W. (2006). . Introduction. In: Blackburn, C. de W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead. pp. xvii-xxiii.
- Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., & Płaszczyk, M. (2004). Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource technology*, 95(1), 15-18.
- 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.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2016). *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Woodhead Publishing.
- Bourgeois, C. M., Mescle, J., & Zucca, M. J. (1988). *Microbiologie Alimentaire: Aspect microbiologie de la sécurité et la qualité alimentaires*. Technique et Documentation Lavoisier.

C

- Cahagnier, B., Dragacci, S., Frayssinet, C., Frémy, J., Hennebert, G., Lesage-Meessen, L., Multon, J., Richard-Molard, D., & Roquebert, M. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. *Lavoisier Tec et Doc, Paris*, 85-88.

Christian, J. H. B. (2000). Drying and reduction of water activity. In B. M. Lund, T. C. BairdParker, & G. W. Gould (Eds.), *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, (pp. 146–174).

Castan, C. (2016). *La levure de bière: un champignon aux multiples bienfaits pour la santé et la beauté* UNIVERSITE DE MONTPELLIER].

D

Davidson, P.M., Critzer, F.M., 2012. Interventions to inhibit or inactivate bacterial pathogens in foods. In: Oyarzabal, O.A., Backert, S. (Eds.), *Microbial Food Safety: An Introduction*. Springer, New York, NY, pp. 189—202.

Deak T. Foodborne yeasts. *Adv Appl Micro-bio* l 1991 ; 36: 179-278.

Diguta, C. F. (2010). *Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin* Université de Bourgogne; Universitatea București].

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.

Deak, T., & Beuchat L. R. (1996). . *Handbook of food spoilage yeasts*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Desbordes, D. (2003). Qualité microbiologique des fruits et légumes: flores, altérations, risques sanitaires, prévention. *Rapport de Recherche Bibliographique*, 20-23.

E

Efiuvwevwere, B., & Oyelade, J. (1991). Biodeteriorative and physico-chemical changes in modified atmosphere packaged oranges and the microbial quality of the preserved and unpreserved juice. *Tropical science*.

European Brewery Convention. *Analytica Microbiologica – EBC*. Fachverlag Hans Carl, 200.

European Food Safety Authority, 2010. *The Community summary report on trends and sources of zoonoses. Zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2008*. Parma, Italy: European Food Safety Authority.

F

Filtborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85-102.

Fennesy, F. (1997). *Saccharomyces cerevisiae : importance dans le développement des sociétés humaines. Rôle dans l'industrie agro-alimentaire et en thérapeutique*.

G

Gould, G. (1989). Predictive mathematical modelling of microbial growth and survival in foods. *Food Sci. Technol. Today*, 3, 89-92.

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.

Gibson, A. M., Bratchell, N., & Roberts, T. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 6(2), 155-178.

H

Howell, K. (2016). Spoilage: yeast spoilage of food and beverages. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 5. Academic Press, Oxford, pp. 113-117., 113.

Howell, K., 2016. Spoilage: yeast spoilage of food and beverages. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 5. Academic Press, Oxford, pp. 113-117.

J

Joffin.J.C., (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris.

Jay, J. M. (2000). Modern food microbiology. Maryland. In: Aspen Publishers, Inc.

J.M, S. (1995). *Phénomènes d'adhérence et molécules impliquées dans l'interaction entre la levure Candida et son hôte*. Bull Soc Fr Microbiol .

K

Kreyenschmidt, J., & Ibal, R. (2012). 6 Chapter Modeling Shelf Life Using Microbial Indicators. *Shelf life assessment of food*, 127.

Koenig, H. (1995). *Guide de mycologie médicale*. Ellipses.

Kuki, Á., Nagy, L., Zsuga, M., & Kéki, S. (2011). Fast identification of phthalic acid esters in poly (vinyl chloride) samples by direct analysis in real time (DART) tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 303(2-3), 225-228.

L

Laffont, T. B. e. C. (2011). Les contaminations fongiques. *Open Edition journals*, p. 48-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.4000/ocim.994>

Likar, K., & Jevšnik, M. (2006). Cold chain maintaining in food trade. *Food control*, 17(2), 108-113.

M

Modi, H.A., 2009. An introduction to microbial spoilage of foods. In: Modi, H.A. (Ed.), *Microbial Spoilage of Foods*. Aavishkar Publishers, Jaipur, India, pp. 43—66.

Mossel, D. (1971). Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(1), 95-118.

McMeekin, T. A., & Ross, T. (1996). Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 65-83.

Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.

O

Odds, F. (1995). Les agents antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. *Bull Soc Fr Microbiol*, 10, 285-293.

P

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage* (pp. 3-9). Springer.

Praphailong, W., & Fleet, G. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food microbiology*, 14(5), 459-468.

Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.

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 Bioemulsifier From *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products. *LWT Food Sci Tech* 29, 734-7c.

R

Rambaud, J.-C. (2004). *Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives*. John Libbey Eurotext.

Reid, V. J., Theron, L. W., du Toit, M., & Divol, B. (2012). Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6838-6849.

Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., & Flandrois, J.-P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 610-616.

Rosso, L. (1995). *Modélisation et microbiologie prévisionnelle: Elaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire* Lyon 1].

Roberts, T. (1995). Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *International biodeterioration & biodegradation*, 36(3-4), 297-309.

S

Shenasi, M., Aidoo, K. E., & Candlish, A. A. (2002). Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 113-119.

Snyder, A. B., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2019). Association of fungal genera from spoiled processed foods with physicochemical food properties and processing conditions. *Food microbiology*, 83, 211-218.

Silliker, J. H. (1980). *Microbial ecology of foods*. Academic Press.

Sperber, W. H. (2009). Introduction to the microbiological spoilage of foods and beverages. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 1-40). Springer.

Sperber, W. H. (1983). Influence of water activity on foodborne bacteria—a review. *Journal of Food Protection*, 46(2), 142-150.

Suhartatik, N., Nurjanah, M., & Kuswanto, K. R. (2018). Isolation and Identification of Osmophilic Yeast from Unripe Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.). *Indonesian Journal of Agricultural Research*, 1(3), 269-279.

T

Tabuc, C. (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*.

Todd, E. C. (1987). Impact of spoilage and foodborne diseases on national and international economies. *International Journal of Food Microbiology*, 4(2), 83-100.

Tchango-Tchango, J., Njiné, T., & Tailliez, R. (1992). Qualité microbiologique de jus et nectars de fruits exotiques. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, 10(2), 199-206.

W

Winslow, C.-E., & Walker, H. H. (1939). The earlier phases of the bacterial culture cycle. *Bacteriological Reviews*, 3(2), 147-186.

Z

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

Zwietering, M. H., Wiltjes, T., DE WIT, J. C., & RIET, K. V. T. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55(12), 973-979.

ANNEXES**1/ Produits utilisés**

- Milieu de culture Sabouraud.
- Borate de sodium (Borax)
- Naoh
- HCL
- milieu OGYA (Oxytetracycline Glucose Yeast Agar)
- 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 bleus et jaunes stériles
- Étuve réfrigérer
- flacons en pyrex couverts avec du papier aluminium
- Septums couvert par du papier aluminium
- Embouts blancs couverts par du papier aluminium
- Balance de paillasse +balance précision
- plaque agitatrice multipostes + Petits barreaux aimanté
- agitateure magnétique
- Fiole joggée 100 ml
- Béchers
- Boites de pétri
- Portoirs
- Bec bunsen
- Spatule
- Pissette
- Vortex
- Autoclave

3/ Volume de la cellule de Thoma

La cellule de Thoma possède un grand carré central (1 mm^2), ce qui fait que son volume est de $0,1 \text{ mm}^3$ (10^{-4} ml). Ce grand carré est subdivisé en 16 carrés, eux-mêmes subdivisés en 16 petits carrés. Les petits carrés ont $0,05 \text{ mm}$ de côté et une profondeur de $0,1 \text{ mm}$, de sorte que le volume de chaque petit carré est de $0,00025 \text{ mm}^3$ ($25 \times 10^{-8} \text{ ml}$). Il est également possible de compter dans les carrés moyens. Chaque carré moyen a 16 petits carreaux de $0,2 \text{ mm}$ de côté, et d'un volume de $0,004 \text{ mm}^3$ soit $4 \times 10^{-6} \text{ ml}$