Article original

Mise au point d'une méthode de dénombrement de la totalité des cellules de levures de la surface d'un fromage à pâte molle

MN Leclercq-Perlat ¹, JL Bergère ², G Corrieu ¹

¹ Laboratoire des procédés biotechnologiques agro-alimentaires ;

² Laboratoire de la Chaire de technologie, Institut national de la recherche agronomique,
78850 Thiverval-Grignon, France

(Reçu le 7 septembre 1994 ; accepté le 5 janvier 1995)

Résumé — Une méthode de numération des cellules de levures de la surface des fromages à pâte molle à l'aide d'un compteur de particules Coulter est développée. Cette méthode est fondée sur la solubilisation du caillé par le réactif de transparisation de Driehuis et Teernstra (1992) tamponné à pH 12. Les meilleures conditions de transparisation sont 30 min à 37°C. Les numérations avec le compteur Coulter des suspensions de cellules de souches pures de *Kluyveromyces lactis* et de *Geotrichum candidum* en présence de transparisant sont comparées avec les résultats obtenus par les méthodes de mesure de la quantité de matière sèche, d'estimation turbidimétrique de la quantité de matière et par comptage microscopique direct. La méthode de mesure de la quantité de matière ne peut pas être utilisée parce qu'il y a une adsorption irréversible et non reproductible du réactif dans les cellules de levures. Les cellules de *K lactis* et *G candidum* sont relativement plus résistantes au réactif de transparisation que les bactéries lactiques. La plupart des cellules de levures sont tuées mais gardent leur forme générale. En outre, le réactif de transparisation dissocie les amas et les mycéliums. Pour cette raison, la numération au compteur Coulter peut être utilisée. Le réactif de transparisation réduit la turbidité cellulaire de $30 \pm 3\%$ pour *K lactis* et de $23 \pm 3\%$ pour *G candidum*. La méthode turbidimétrique peut être utilisée pour une souche en culture pure mais non pour les mélanges de levures existant en surface des fromages. Le dénombrement des cellules à l'aide du compteur Coulter entraîne une sous-estimation de 30% par rapport au dénombrement microscopique. Après traitement des suspensions de levures en mélange par le réactif de transparisation, la méthode de numération avec le compteur de particules permet une détermination rapide de la concentration totale en cellules et une estimation de la distribution des cellules en fonction de leurs diamètres. De plus, elle permet d'estimer, pour chaque souche en présence, la concentration cellulaire totale et la distribution, si la différence des diamètres moyens est supérieure ou égale à 1 μm .

dénombrement / levure / compteur Coulter / fromage à pâte molle / transparisation

Summary — Quantitative method for enumeration of yeast cells in surface of soft cheese. A method was developed allowing Coulter Counter numeration of yeasts in soft cheeses without interference of casein micelles and fat globules. Casein and fat of a soft cheese suspension were completely solubilized by treating samples with 19 volumes of Driehuis and Teemstra (1992) transpatisation reagent buffered at pH 12. The best conditions of transpatisation were 30 min at 37 °C. The yeast dry weight, turbidimetric absorbance, microscopic count and Petri dish count methods were chosen as reference methods. After transpatisation, the dry weight method could not be used because an irreversible adsorption of transpatisation reagent on yeast cells took place and this reaction was not reproducible. Treatment of pure cultures of *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum* with transpatisation reagent reduced the cellular turbidity respectively by $30 \pm 3\%$ and $23 \pm 3\%$. The turbidity reduction by transpatisation depends on the type of strains and general form of cells. The turbidity method could be used for a strain in pure culture but not for the yeast mixture that exists on soft cheeses. It seemed that these yeast strains were relatively more resistant to the transpatisation reagent than lactic acid bacteria. The transpatisation killed the majority of initial viable cells of yeasts but it did not change their general morphology. For this reason, the Coulter Counter method could be used. Transpatisation treatment dissociated aggregated cells and/or myceliums. Before and after transpatisation treatment, the Coulter Counter numeration values could be plotted against microscopical counts. After transpatisation of mixtures of yeast strains in the presence of soft cheese components, the Coulter Counter method allows a rapid determination of total yeast cell concentration and of a cell size distribution. It also allows an estimation of total cell concentration for each strain and its distribution, if the difference between the average diameters of yeast strains was higher than 1 μm .

enumeration / yeast / Coulter Counter / soft cheese / transpatisation

INTRODUCTION

Les problèmes d'hygiène microbienne et de maîtrise des fabrications fromagères posés par l'existence d'une flore de surface responsable de l'affinage des fromages à pâte molle sont l'une des principales préoccupations des industriels fromagers. Il est généralement admis que cette flore est composée d'une grande variété d'espèces microbiennes appartenant à des groupes différents (levures, bactéries, moisissures). La population totale atteint généralement 10^9 - 10^{10} germes viables par gramme de croûte, parfois plus. Ce nombre varie assez peu au cours de la maturation, bien que les équilibres entre les différentes espèces soient en constante évolution. Cet équilibre dépend des conditions de développement propres à chaque groupe et est donc influencé par les caractéristiques physico-chimiques du milieu (aw, pH, composition...) et de l'environnement (température, atmosphère, humidité relative...). En outre, entre les différents groupes microbiens peuvent se

produire des effets d'association, de stimulation ou d'opposition. Ainsi, pour obtenir des fromages à caractéristiques constantes, il faut connaître et maîtriser les conditions physico-chimiques et microbiologiques de l'affinage des fromages à flore de surface. Une conduite plus rationnelle de l'affinage de ces fromages nécessite une meilleure connaissance du comportement, du développement, de l'état physiologique et de l'activité des populations mixtes de micro-organismes constituant la flore de surface. Cela implique en particulier de quantifier la concentration en cellules «viables» et «non viables» (dénommée concentration totale) en différenciant si possible les différentes espèces présentes en surface des fromages.

Afin d'évaluer rapidement la concentration microbienne totale de cultures pures, un procédé optique (turbidimétrie ou néphélométrie) étudiant la dispersion de la lumière par les particules en suspension dans un liquide limpide ou faiblement coloré est généralement utilisé. Pour les produits lai-

tiers et les suspensions de fromage, ces techniques nécessitent une étape d'élimination des constituants insolubles (caséines, globules gras) (Kouomagne *et al*, 1984 ; Driehuis et Teerstra, 1992).

La mesure directe de la quantité de matière sèche permet également d'évaluer la concentration totale en micro-organismes des produits laitiers par mesure du poids sec après solubilisation des constituants insolubles (Linden *et al*, 1987). Cependant dans le cas des suspensions de fromage, cette méthode n'a pas été testée. D'après Guiraud et Galzy (1980), le dénombrement direct au microscope est aussi une technique utilisable pour déterminer la concentration des micro-organismes dans les aliments. Cependant, ce type de numération déjà long et fastidieux dans le cas de cultures pures est rendu plus difficile par la complexité de la microflore présente en surface des fromages. Les méthodes immunologiques peuvent aussi permettre, suivant la spécificité des anticorps utilisés, de déterminer les concentrations totales en cellules ou la concentration d'un micro-organisme donné d'un mélange (Notermans *et al*, 1986).

Les comptages électroniques de particules par cytométrie de flux ou comptages de type Coulter permettent également de déterminer la concentration cellulaire totale d'un micro-organisme en culture pure ou en mélange. Dans le cas de la cytométrie de flux, très peu d'études ont été faites sur les produits alimentaires tels que le fromage et le coût des équipements étant prohibitif, cette méthode bien que prometteuse est encore très peu utilisée (Hadley *et al*, 1985). Au contraire, les compteurs de particules de type Coulter sont très utilisés en industrie alimentaire, en particulier pour le contrôle des mouls de bière en brasserie (Saucedo-Castaneda *et al*, 1992) ou celui des suspensions ou des émulsions (Cornell et Pallansch, 1966; Wayne et Peak, 1976; Baruch *et al*, 1979 ; Surak *et al*, 1979 ;

Chesworth *et al*, 1985). Quelques études (Quinn *et al*, 1981; Kutbitschek et Friske, 1986 ; Bourgeois et Mafard, 1991) montrent qu'il est possible de dénombrer avec les compteurs de particules de type Coulter des micro-organismes autres que *Saccharomyces cerevisiae* de la bière. Avec ce type d'appareils, il est possible de déterminer non seulement la concentration totale en cellules d'un micro-organisme en culture pure mais aussi la répartition des cellules en fonction de leur volume. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée dans le cas des mélanges de micro-organismes tels que ceux existant en surface des fromages à flore de surface.

La quantification des concentrations totales des micro-organismes présents dans les suspensions fromagères par ces méthodes nécessite la solubilisation complète des constituants insolubles (caséines, matières grasses) à l'aide de détergents et de solvants miscibles entre eux (technique appelée «transparisation») (Kanasaki *et al*, 1975). Il est généralement admis que les solvants des protéines dispersent les caséines et ceux des lipides assurent la miscibilité de tous les constituants insolubles, alors que les détergents complètent les propriétés des solvants en abaissant les tensions superficielles du mélange (Guinamp *et al*, 1989).

Comme très peu d'études de la littérature traitent de la solubilisation des constituants insolubles du fromage, nous avons étudié les travaux concernant le lait entier, en sachant que les caséines et les lipides des fromages à pâte molle ont des structures différentes et des concentrations d'environ 10 et 6 fois respectivement plus élevées que celles du lait.

Kanasaki *et al* (1975) solubilisent les caséines à l'aide d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) en milieu fortement alcalin (pH = 12). Kouomagne *et al* (1984) et Linden *et al* (1987) ont mis au point des réactifs de transparisation agissant aussi

bien sur les caséines que sur les matières grasses mais notent comme Driehuis et Teernstra (1992) qu'ils provoquent une diminution importante ($\geq 50\%$) de la turbidité cellulaire des cultures bactériennes. Cette propriété limite l'utilisation de ces réactifs pour estimer par turbidimétrie la concentration bactérienne des produits laitiers y compris celle des fromages. Plus récemment, Driehuis et Teernstra (1992) développent une méthode turbidimétrique (absorbance à 650 nm) permettant d'estimer la concentration en bactéries lactiques du lait entier sans interférence due à l'opacité de la suspension. Pour un temps de contact réactif/cellules inférieur à 30 min, la turbidité cellulaire est réduite d'au moins 40% selon les souches.

Pour mieux connaître le développement de la flore de surface des fromages à pâte molle et en particulier celui des levures, nous nous proposons de fabriquer aseptiquement à partir d'un lait pasteurisé des fromages à pâte molle et à croûte lavée en limitant le nombre de souches impliquées lors de l'affinage. En vue de cette étude, nous nous proposons de mettre au point d'une part un réactif de transpiration efficace sur ce type de caillés et d'autre part de définir une méthode permettant de déterminer la quantité totale de cellules dans des suspensions de levures en culture pure ou en mélange. Vu la complexité de la flore levure en surface des fromages à pâte molle, nous avons choisi pour notre étude deux des espèces de levures les plus fréquentes : *Geotrichum candidum* et *Kluyveromyces lactis*. Dans le cas de l'application à ces mélanges, nous testerons la mesure de la quantité de matière cellulaire sèche (Linden *et al*, 1987) et la détermination turbidimétrique (Driehuis et Teernstra, 1992) qui permettent de déterminer globalement la quantité de cellules et d'autre part la numération au compteur de particules de type Coulter qui permet de dénombrer les cellules de levures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Étude de la transpiration des suspensions de caillés

Préparation des suspensions fromagères

Les caillés lactique ou présure sont préparés le plus stérilement possible (hotte à flux laminaire) à partir d'un même lot de lait pasteurisé.

Le caillé de type lactique est préparé avec la bactérie lactique mésophile *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LA) (CNRZ 144). Afin de réaliser la coagulation lactique, une préculture de LA est additionnée au lait à raison de 3%. L'incubation a lieu à 30°C jusqu'à coagulation complète du lait (pH = 4,6). Puis, le coagulum est découpé à l'aide d'une grille stérile et est laissé 1 h au repos afin de favoriser l'exsudation spontanée du lactosérum. L'égouttage est complété premièrement par une filtration lente sur gaze stérile et deuxièmement par une centrifugation de 30 min à 4500 g réalisée avec une centrifugeuse Jouan modèle SR 20-22 (Jouan, Saint-Nazaire, France). Après égouttage, les caillés sont stockés stérilement à 4°C pendant au plus 2 j.

Pour préparer le caillé présure, nous utilisons une présure Boll à 520 mg/l de chymosine conservée à 4°C. Avant utilisation, elle est diluée au 1/10^e avec de l'eau physiologique puis stérilisée par filtration (porosité 0,2 µm). 2,5 ml de cette présure sont ajoutés goutte à goutte à 1 l de lait. Après homogénéisation, le lait est laissé au repos à une température de 25°C jusqu'à coagulation complète (≈ 2 h). Après découpage, le coagulum est laissé au repos 1 h. L'égouttage est réalisé par une succession de 4 filtrations lentes (réalisées sur gaze stérile) et de 4 décantations (15 min). À chaque étape, les coagulums sont découpés à l'aide d'un couteau stérile afin d'augmenter la surface d'exsudation et sont brassés par agitation manuelle afin d'amplifier le phénomène. Comme le caillé lactique, le caillé présure est conservé au plus 2 j à 4°C.

Sur chaque caillé, sont systématiquement réalisées les analyses suivantes : mesure de la matière sèche (AFNOR, 1985) et dénombrements de la flore totale et de la flore levure (Piton, 1988) afin de vérifier que l'humidité et les concentrations microbiennes sont analogues à celles des caillés industriels.

Quel que soit le type de caillé, la suspension fromagère est préparée comme décrit par Humbert *et al* (1982). Après broyage du caillé dans un mortier stérile, 5 g de caillé sont mis en suspension dans un flacon contenant 45 ml d'eau physiologique stérile. Afin de ramollir la pâte fromagère, la suspension est incubée 1 h à 50°C. La suspension ainsi obtenue est homogénéisée (Ultra-Turrax, 20 500 trs/min, 2 min) et immédiatement utilisée.

Procédure de transparisation

Les 2 réactifs suivants sont testés. Le premier est celui de Kanasaki *et al* (1975), qui consiste à clarifier la suspension fromagère par ajustement de son pH à 12 en présence d'EDTA à 0,4% (m/v). L'autre est celui que Driehuis et Teernstra (1992) utilisent pour clarifier le lait entier. Cependant, la transparisation avec ce réactif est plus efficace lorsque son pH est ajusté à 12.

La transparisation des suspensions fromagères au cours du temps est suivie d'une part par mesure de l'absorbance à 650 nm (Driehuis et Teernstra, 1992) avec un spectrophotomètre Shimadzu modèle UV 160A et d'autre part avec le compteur de particules de type Coulter Z1. Elle est complète lorsque l'absorbance ou la concentration en particules de la suspension fromagère est égale à celle du blanc (0,5 ml d'eau + 9,5 ml de réactif).

L'efficacité des réactifs sur les suspensions fromagères est définie par le rapport suivant :

– cas de la mesure d'absorbance :

$$\text{efficacité} = 1 - \frac{DO_{\text{suspension transparisée}}}{DO_{\text{suspension sans réactif}}} \quad 1a$$

– cas de la mesure de la concentration au compteur de particules :

$$\text{efficacité} = 1 - \frac{C_{\text{Coulter suspension transparisée}}}{C_{\text{Coulter suspension sans réactif}}} \quad 1b$$

0,5 ml d'une suspension fromagère est mélangé avec 9,5 ml de réactif de transparisation puis le mélange est incubé soit à 25°C soit à 37°C pendant un temps variable. Chaque essai est réalisé en triple et sur au moins 3 suspensions fromagères différentes. L'efficacité de la transparisation des suspensions fromagères est

suivie pendant 90 min avec mesure toutes les 10 min.

Choix des souches et préparation des cultures

Dans la collection du laboratoire, les souches de *Geotrichum candidum* G36 et G48, toutes 2 de type levuriforme selon Guéguen (1984) et la souche de *Kluyveromyces lactis* 44_g ont été choisies.

Pour les cultures en milieu liquide, les levures sont cultivées en bouillon constitué d'un extrait autolytique de levure (5 g/l, Biokar) et de glucose (15 g/l, Prolabo) dont le pH est ajusté à 5,5. L'incubation s'effectue à 25°C sous agitation continue pendant 2 à 18 jours selon les essais. Les cultures de surface sont réalisées sur un milieu gélosé (pH 5,0) de composition simulant celle du fromage : peptone de caséine de type bio-trypcase (15 g ; Bio-Mérieux), lactate de sodium à 60% (38 ml ; Prolabo), extrait autolytique de levure (1 g ; Biokar), chlorure de calcium (0,1 g ; Prolabo), sulfate de magnésium (0,5 g ; Prolabo), phosphate de potassium (6,8 g ; Prolabo), chlorure de sodium (10 g ; Prolabo), lactose (20 g ; Prolabo), galactose (6 g ; Labosi), agar bactériologique de type E (18 g ; Biokar) et eau (1000 ml). Après ensemencement en surface par étalement d'une préculture liquide, l'incubation est réalisée à 25°C pendant 1 à 7 jours selon les essais. La couche microbienne produite sur chaque boîte de Pétri est prélevée stérilement puis mise en suspension dans 45 ml d'eau physiologique stérile. Quel que soit le type de culture et le traitement subi ou non, la suspension cellulaire est homogénéisée à l'aide d'un Ultra-Turrax (T25, Janke Kundel) (20 500 trs/min, 2 min).

Étude de la concentration en levures

Pour *K. lactis*, les cellules sont dénombrées avec une cellule de Thoma après coloration des cellules par addition d'un mélange bleu de méthylène-glucose selon le protocole de Lee *et al* (1981), ce qui permet de compter les cellules viables et les autres. L'état des cellules avant et après transparisation est également observé par microscopie à contraste de phase (grossisse-

ment 100). Par ailleurs, la concentration totale en cellules des suspensions microbiennes, avant et après transparisation, est déterminée par mesure de l'absorbance, pesée de la matière sèche et numération avec un compteur de particules Coulter.

Les mesures d'absorbance sont réalisées avec un spectrophotomètre Shimadzu UV 160 à 650 nm (Driehuis et Teernstra, 1992). La relation absorbance-quantité de cellules est linéaire pour les absorbances comprises entre 0,4 et 0,7. Chaque suspension est diluée de sorte que son absorbance soit dans cette plage. Puis l'absorbance de la suspension est calculée en tenant compte du facteur de dilution.

La mesure de la quantité de matière sèche est réalisée sur membrane de filtration en acétate de cellulose selon la procédure décrite par la norme AFNOR NF 04-282 (1985). Le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) réagissant avec les membranes utilisées, 3 centrifugations successives de 15 min à 4500 *g* sont ajoutées au protocole. Après chaque centrifugation, le culot microbien est remis en suspension dans de l'eau physiologique (dilution 4/10) et la suspension est homogénéisée à l'aide du broyeur Ultra-Turrax (20 500 trs/min, 2 min).

Le principe du compteur de particules de type Coulter (modèle Z1, Coultronics France, 91 Margency) est décrit en détail par Cornell et Palansch (1966). Son étalonnage est réalisé comme décrit par le constructeur. L'analyse du nombre de particules par ml de suspension permet de déterminer la concentration totale en particules de la suspension. La distribution des particules de la suspension selon leur diamètre *D* est calculée afin de déterminer l'existence d'une ou plusieurs populations ainsi que leur diamètre équivalent. La proportion de chaque population de la suspension est estimée en mesurant la surface de son pic avec un planimètre. A chaque diamètre *D*, 5 dénombrements successifs sont effectués et sa population est calculée par leur moyenne arithmétique. Pour chaque suspension de levures, 3 déterminations successives sont réalisées.

Il est nécessaire de vérifier que cette méthode est utilisable pour des cultures en mélange. Pour cela, 5 cultures de *G. candidum* et 5 de *K. lactis* sont réalisées en milieu liquide et incubées de 2 à 18 jours à 25°C. Les concentrations totales et les distributions en cellules des cultures pures sont d'abord déterminées par numération au compteur Coulter. Les cultures pures sont ensuite mélangées en proportions connues (1/4, 1/3, 1/2,

1/1, 2/3, 3/4). La concentration et la distribution de la population de ces mélanges sont déterminées au compteur. Les résultats ainsi obtenus sont dits «réels». À partir des valeurs déterminées pour les cultures pures en considérant les proportions de chaque mélange, nous calculons les concentrations et les courbes de distribution des deux espèces en mélange. Les résultats ainsi obtenus sont dits «calculés». La comparaison des résultats «réels» et «calculés» pour chaque mélange permet de vérifier que la méthode s'applique aux populations mixtes.

RÉSULTATS

Efficacité de la transparisation des suspensions de caillé

Efficacité calculée à partir de l'absorbance

Les caillés lactiques présentent un extrait sec de $44,0 \pm 0,5\%$ et une flore microbienne totale voisine de 10^9 – 10^{10} UFC/g alors que les caillés de type présure ont un extrait sec de $43,0 \pm 0,5\%$ et une flore microbienne totale inférieure à 5000 UFC/g. Dans tous les cas, la flore levure est inférieure à 500 germes viables/g.

Des essais préliminaires permettent de montrer que l'absorbance à 650 nm des réactifs est voisine de celle de l'eau ($0,055 \pm 0,005$). Il n'y a donc pas d'interférences dues aux réactifs. De même, pour les conditions opératoires utilisées, l'efficacité de transparisation du caillé présure avec le réactif de Kanasaki *et al* (1975) est identique à celle du caillé lactique et elle est au mieux de 30% pour des temps de contact réactif-caillé supérieurs à 25 min.

Les résultats présentés sur la figure 1 sont la moyenne des essais de transparisation avec le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) modifié et sont donnés à $\pm 5\%$. Ils permettent de montrer que l'efficacité de transparisation est fonction des conditions

opérateurs. Quel que soit le caillé, la transparation n'est jamais complète à 25°C. Pour les caillés lactiques, à 37°C elle est au mieux voisine de 90% pour des temps de contact réactif/caillé supérieurs à 90 min, alors qu'elle est quasiment totale à 37°C pour les caillés de type présure lorsque le temps de contact réactif/caillé est supérieur à 20 min. De plus, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour le réactif de Kanasaki *et al* (1975) permet de montrer que, quelles que soient les conditions de transparation, le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) modifié est le plus efficace. En effet, l'efficacité de transparation avec ce réactif est au minimum 2 fois plus élevée que celle du réactif de Kanasaki *et al* (1975).

L'observation microscopique des suspensions transparées ne permet pas de déterminer si la différence d'absorbance entre caillé lactique et caillé présure est due à la présence des micro-organismes et/ou de particules insolubles de caillé.

En conclusion, le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) dont le pH est ajusté à 12 est le plus efficace sur les suspensions de caillés lorsqu'il est utilisé à 37°C.

Efficacité calculée à partir des numérations au compteur Coulter

Au vu des résultats précédents, l'étude de la transparation des caillés avec le compteur Coulter est limitée à celle du réactif de Driehuis et Teernstra (1992) utilisé à pH 12 et à 37°C pendant 15 à 30 min. En effet, Miozzari *et al* (1978) montrent que le Triton X100 utilisé à 37°C pendant plus de 30 min provoque la destruction quasi totale des cellules de levures.

Les résultats présentés sur la figure 2 sont la moyenne des essais et sont donnés à $\pm 5\%$. Ils permettent de conclure que, pour le caillé présure, aucune différence notable de transparation entre les suspensions transparées 15 ou 30 min n'est mise en

évidence, alors que pour le caillé lactique, une différence importante d'efficacité de transparation est observée entre les suspensions transparées 15 min et celles qui le sont pendant 30 min. En effet, lorsque le temps de contact caillé lactique/réactif est de

Fig 1. Efficacité de transparation des caillés purement lactiques et purement présures par le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) tamponné à pH 12 calculée à partir des mesures d'absorbance à 650 nm.

Transparation efficiency of lactic curds and rennet curds with Driehuis et Teernstra (1992) transparation reagent at pH 12, estimated from turbidimetric results.

Fig 2. Efficacité de transparation des caillés de type purement lactique et purement présure par le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) tamponné à pH 12, calculée à partir des numérations au compteur de particules.

Transparation efficiency of lactic curds and rennet curds with Driehuis et Teernstra (1992) transparation reagent at pH 12, estimated from Coulter Counter results.

30 min, l'efficacité de la transparisation est du même ordre de grandeur que celle du caillé présure. En revanche, lorsque le temps de contact caillé lactique/réactif est inférieur ou égal à 15 min, dans le cas des particules de diamètre inférieur à 2,5 μm , la transparisation est nettement plus faible que celle obtenue pour le caillé présure. De plus, quel que soit le type de caillé, pour les particules de diamètre inférieur à 2 μm , la transparisation n'est jamais totale, puisque l'efficacité est inférieure à 90%, et ce, quel que soit le temps de contact cellules/réactif.

En conclusion, le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) modifié est totalement efficace sur toutes les particules de caillé de diamètre supérieur ou égal à 2 μm lorsqu'il est utilisé à 37°C pendant 30 min.

Effet du réactif de transparisation sur les levures

Au vu des résultats de la transparisation des caillés, nous limiterons l'étude de l'effet du réactif de Driehuis et Teernstra (1992) modifié (pH = 12) sur les levures aux conditions de transparisation suivantes : 15 ou 30 min à 37°C.

Des essais préliminaires nous ont permis de constater que :

- pour les cultures non traitées par le réactif (appelées «témoin»), les centrifugations provoquent une agglomération des cellules variant de 10 à 40% selon les essais, même après traitement à l'Ultra-Turrax ; cela est vérifié par observation au microscope et par numération au compteur de particules ;
- le poids cellulaire sec des cultures après action du réactif est systématiquement supérieur à celui des cultures «témoin» ; cette augmentation varie de 10 à 200% selon l'essai et est plus élevée pour *K lactis* que pour *G candidum* ;

– après action du réactif, l'observation microscopique ne permet pas de déceler des différences d'aspect des cellules entre les cultures traitées 15 ou 30 min.

Au vu de ces premiers essais, la méthode de détermination de la concentration totale par mesure de la quantité de matière sèche n'est donc pas utilisable pour des suspensions de levures transparisées.

Chaque prélèvement est divisé en 3 parties égales, la première est le «témoin» et ne subit pas le traitement par le réactif, la seconde est traitée par le réactif pendant 15 min et la dernière pendant 30 min. Sur chacune de ces parties, les méthodes suivantes : absorbance à 650 nm, numérations au compteur Coulter, numérations avec la cellule de Thoma et dénombrement des cellules viables sont testées simultanément.

Selon ce protocole, nous testons 2 cultures de *G candidum* G36 en milieu liquide incubées de 2 à 18 jours à 25°C et 2 réalisées sur milieu solide incubées de 2 à 7 jours à 25°C. De même, 2 cultures de *K lactis* 44_g en milieu liquide et 2 réalisées sur milieu solide sont traitées. Les cultures de *K lactis* sont incubées dans les mêmes conditions que celles de *G candidum*. Quelle que soit la culture, un prélèvement est réalisé tous les 2 ou 3 jours.

Quel que soit le type de culture (liquide ou de surface), l'observation microscopique permet de constater qu'avant transparisation, les cellules de *K lactis* sont ovales, alors que celles de *G candidum* G36 sont soit «ovoïdes» (cultures A et D) soit sous forme d'articles mycéliens et de mycéliums (cultures B et C).

Mesure de la biomasse par absorbance à 650 nm

Les résultats de mesure de la biomasse des cultures de *G candidum* G36 et de *K lactis* par absorbance sont donnés respectivement dans les tableaux I et II. Chaque résultat est la moyenne de 8 valeurs et est donné à $\pm 5\%$.

Tableau I. Mesure de l'absorbance à 650 nm pour la souche de *G candidum* G36 avant et après action du réactif de transparisation.*Absorbance at 650 nm of cultures of G candidum G36 before and after transparisation treatment.***A. Cultures en milieu liquide**

	Culture A			Culture B		
Numéro essai	A1	A2	A3	B4	B5	B6
Culture âgée de (j)	3	11	18	2	9	17
Aspect microscope	Mycéliums < 10%			Mycéliums > 85%		
Témoin	5,3	5,7	6,4	3,1	3,3	3,2
Réactif 15 min	4,3	4,4	4,4	2,1	2,3	2,7
Réactif 30 min	4,2	4,5	4,3	2,1	2,6	2,8

B. Cultures sur milieu solide

	Culture C			Culture D		
Numéro essai	C7	C8	C9	D10	D11	D12
Culture âgée de (j)	2	7	10	3	7	12
Aspect microscope	Mycéliums = 50%			Mycéliums < 10%		
Témoin	3,4	3,9	3,8	4,1	16	16
Réactif 15 min	2,7	3,1	2,9	3,3	16	16
Réactif 30 min	2,8	3,1	2,9	3,3	16	16

Les résultats en absorbance présentés sont représentatifs de l'ensemble des essais et sont donnés à $\pm 5\%$.
 «Témoin» désigne la culture non traitée.

These results are representative of all tests and given at $\pm 5\%$. Témoin is the culture before transparisation.

Tableau II. Mesure de l'absorbance à 650 nm pour la souche de *K lactis* 44_g avant et après action du réactif de transparisation.*Absorbance at 650 nm of cultures of K lactis 44_g before and after transparisation treatment.***A. Culture en milieu liquide**

Numéro essai	1	2	3	4	5
Culture âgée de (j)	2	5	7	10	17
Témoin	6,2	6,4	6,6	6,8	7,5
Réactif 15 min	4,8	4,6	4,7	4,6	5,0
Réactif 30 min	4,7	4,6	4,7	4,4	5,1

B. Culture sur milieu solide

Numéro essai	6	7	8	9	10
Culture âgée de (j)	2	3	5	6	7
Témoin	4,1	4,6	5,2	5,3	5,3
Réactif 15 min	2,9	3,2	3,9	4,0	3,9
Réactif 30 min	2,8	3,2	3,8	3,9	3,9

Les résultats en absorbance présentés sont représentatifs de l'ensemble des essais et sont donnés à $\pm 5\%$.
 «Témoin» désigne la culture non traitée.

These results are representative of all tests and given at $\pm 5\%$. Témoin is the culture before transparisation.

Ces essais permettent de remarquer que la répétabilité des mesures d'absorbance est bonne (> 95%). Quelle que soit la souche, aucune différence n'est observée entre les cultures traitées 15 ou 30 min par le réactif. De plus, quel que soit le temps de contact cellules/réactif, la turbidité cellulaire après action du réactif est plus faible que celle des cultures «témoin». Cette diminution constante, quels que soient l'âge ou les conditions de culture, est de $23 \pm 5\%$ pour *G. candidum* G36 et de $30 \pm 4\%$ pour *K. lactis*.

Numération avec le compteur de particules

L'examen microscopique à fort grossissement montre que la plupart des cellules sont

affectées surtout au niveau du contenu cellulaire, mais elles ne sont pas désintégrées, gardent leur forme générale et restent donc comptables.

Cas des cultures de levures pures

Pour *K. lactis*, quels que soient l'âge et le type de culture (liquide ou surface), la comparaison de la concentration totale obtenue avec le compteur Coulter avec celle donnée par la cellule de Thoma montre l'existence d'une corrélation linéaire (coefficient de régression 0,98) entre les résultats obtenus par ces 2 méthodes. Cependant, les concentrations obtenues avec le compteur sont systématiquement inférieures d'environ 30% à celles déterminées avec la cellule de Thoma. Cette différence est due à l'impossibilité de différencier, avec

Tableau III. Numération des cultures de *G. candidum* G36 avant et après transpiration. *Coulter Counter enumerations of G. candidum G36 before and after transpiration.*

A. Culture en milieu liquide

Essai	Culture A			Culture B		
	A1	A2	A3	B4	B5	B6
Culture âgée de (j)	3	11	18	2	9	17
<i>Témoin</i>						
C (part/ml)	$2,3 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^6$
D ₁ (μm)	6,7	5,9	5,3	8,4	9,2	7,3
(C ₁) (%)	(100)	(81)	(71)	(06)	(06)	(16)
D ₂ (μm)	—	11,7	10,6	16,8	14,6	14,6
<i>Réactif 15 min</i>						
C (part/ml)	$2,9 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$
D ₁ (μm)	5,3	4,8	4,8	6,7	7,3	7,3
(C ₁) (%)	(92)	(80)	(80)	(20)	(36)	(22)
D ₂ (μm)	10,6	10,8	10,6	16,8	14,6	14,6
<i>Réactif 30 min</i>						
C (part/ml)	$3,2 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^6$
D ₁ (μm)	5,3	4,8	4,8	6,7	7,3	7,3
(C ₁) (%)	(92)	(78)	(80)	(13)	(29)	(18)
D ₂ (μm)	10,6	10,8	10,6	16,8	14,6	14,6

Tableau III. Suite

B. Culture sur milieu solide

	Culture C			Culture D		
Essai	C7	C8	C9	D10	D11	D12
Culture âgée de (j)	2	7	10	3	7	12
<i>Témoin</i>						
C (part/ml)	1,1.10 ⁶	6,5.10 ⁶	8,1.10 ⁶	4,4.10 ⁷	4,0.10 ⁷	4,6.10 ⁷
D ₁ (µm)	8,4	9,2	9,4	4,3	5,9	5,3
(C ₁) (%)	(04)	(06)	(12)	(90)	(81)	(71)
D ₂ (µm)	16,8	14,6	16,8	10,6	11,7	10,6
<i>Réactif 15 min</i>						
C (part/ml)	1,9.10 ⁶	9,1.10 ⁶	1,2.10 ⁷	5,2.10 ⁷	4,8.10 ⁷	4,5.10 ⁷
D ₁ (µm)	6,7	7,3	7,4	4,5	4,8	4,8
(C ₁) (%)	(20)	(36)	(42)	(85)	(80)	(80)
D ₂ (µm)	16,8	14,6	14,6	10,8	10,8	10,6
<i>Réactif 30 min</i>						
C (part/ml)	1,9.10 ⁶	9,1.10 ⁶	1,2.10 ⁷	4,5.10 ⁷	4,4.10 ⁷	4,6.10 ⁷
D ₁ (µm)	6,7	7,3	7,4	4,6	4,8	4,8
(C ₁) (%)	(13)	(29)	(36)	(84)	(78)	(80)
D ₂ (µm)	16,8	14,6	14,6	10,8	10,8	10,6

C : concentration totale déterminée au compteur Coulter (particules/ml) ; D₁ : diamètre moyen de la 1^{re} population de cellules ; D₂ : diamètre moyen de la 2^e population de cellules ; %C₁ : pourcentage de la 1^{re} population par rapport à la population totale. La proportion de la 2^e population par rapport à la population totale peut être déduite par la relation 100-%C₁. Les résultats présentés sont représentatifs de l'ensemble des essais et sont donnés à ± 5%.

C, total cell concentration obtained by Coulter Counter (particles/ml); D₁, average diameter for the 1st population of cells; D₂, average diameter for the 2nd population of cells; %C₁, percentage of 1st population in the total population. The percentage of 2nd population in total population was computed by the relation 100-%C₁. These results are representative of all tests and given at ±5%.

le compteur, les cellules bourgeonnantes (cultures jeunes) et celles associées en petits amas (cultures âgées) des cellules individuelles. En effet, après correction des bourgeons et des amas, les résultats obtenus avec le compteur sont très voisins de ceux obtenus par numération au microscope.

Le compteur de particules permet donc de déterminer la concentration totale d'une culture. Les mêmes conclusions sont obtenues

dans le cas des cultures de *G. candidum* G36 formées de cellules «ovoïdes» et la différence entre dénombrements est également voisine de 30%. En revanche, les cultures formées de mycéliums n'ont pu être dénombrées au microscope.

Les résultats des numérations des cultures de *G. candidum* G36 et *K. lactis* sont donnés aux tableaux III et IV et permettent de conclure que :

- la répétabilité de cette méthode de dénombrement est bonne (> 95%) ;
- les résultats obtenus sont indépendants du type de culture (liquide ou de surface) et du temps de contact réactif/cellules ;
- la concentration en cellules de *K lactis* augmente de 5 à 30% et celle de *G candidum* G36 augmente de 10 à 140% par rapport à celle des suspensions «témoin» du fait du traitement par le réactif ;
- pour *G candidum* G36, il existe 2 populations de cellules de diamètre et de morphologie différents (fig 3) alors qu'une seule est obtenue pour *K lactis*; cela confirme l'observation microscopique ;
- pour les cultures de *K lactis* et de *G candidum*, le réactif provoque une diminution d'environ 1 μ m du diamètre équivalent de la première population ; en outre, après transparisation, la proportion de cette popu-

Tableau IV. Numération des cultures de *K lactis* 44₈ avant et après transparisation.
Coulter Counter enumerations of *K lactis* 44₈ before and after transparisation.

A. Culture en milieu liquide

		Numéro de l'essai				
		1	2	3	4	5
Témoin	C (part/ml)	1,4.10 ⁸	1,4.10 ⁸	1,5.10 ⁸	1,6.10 ⁸	1,1.10 ⁸
	D (μ m)	4,9	4,9	3,9	3,9	3,9
Réactif 15 min	C (part/ml)	1,5.10 ⁸	1,8.10 ⁸	1,9.10 ⁸	2,1.10 ⁸	2,1.10 ⁸
	D (μ m)	3,9	3,9	3,1	3,1	3,1
Réactif 30 min	C (part/ml)	1,3.10 ⁸	1,8.10 ⁸	1,9.10 ⁸	2,0.10 ⁸	2,0.10 ⁸
	D (μ m)	3,9	3,9	3,1	3,1	3,1

B. Culture en milieu solide

		Numéro de l'essai				
		6	7	8	9	10
Témoin	C (part/ml)	2,1.10 ⁸	7,3.10 ⁸	1,3.10 ⁹	1,5.10 ⁹	1,6.10 ⁹
	D (μ m)	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
Réactif 15 min	C (part/ml)	2,2.10 ⁸	8,1.10 ⁸	1,6.10 ⁹	1,8.10 ⁹	2,0.10 ⁹
	D (μ m)	3,9	3,9	4,9	3,9	3,9
Réactif 30 min	C (part/ml)	2,1.10 ⁸	7,9.10 ⁸	1,5.10 ⁹	1,8.10 ⁹	2,0.10 ⁹
	D (μ m)	3,9	3,9	4,9	3,9	3,9

C : concentration totale déterminée au compteur Coulter (particules/ml) ; D : diamètre moyen de la population.
«Témoin» désigne la culture non traitée par le réactif. Les résultats présentés sont représentatifs de l'ensemble des essais et sont donnés à $\pm$ 5%.

C, total cell concentration obtained by Coulter Counter (particles/ml); D, average diameter of cell population (μ m).
'Témoin' is the yeast culture before transparisation. These results are representative of all tests and given at $\pm$ 5%.

Fig 3. Exemple de courbes de distribution obtenues sur les suspensions de *Geotrichum candidum* G36 par la méthode de numération au compteur de particules de type Coulter. D1 et D2 sont le diamètre moyen respectivement de la 1^{re} population de cellules et de la 2^e population de cellules. Cas d'une culture liquide incubée 8 jours à 25°C.

Example of distribution curves of Geotrichum candidum G36 obtained with Coulter Counter enumeration. D1 and D2 are respectively first and second cell population average diameter (liquid culture incubated 8 days at 25°C).

lation dans la population totale est supérieure à celle obtenue pour les suspensions non transparisées ;

– pour les cultures de *G candidum* G36 formées de cellules «ovoïdes», la population majoritaire est composée de cellules isolées, de diamètre de 2 à 6 µm selon l'âge et le milieu de culture. La population minoritaire, de diamètre apparent de 10 à 14 µm, est formée seulement de petits amas (2 ou 3 cellules). Pour les autres cultures de G36, la population largement minoritaire (diamètre de 3 à 6 µm) est formée d'articles mycéliens isolés. La population majoritaire (diamètre de 10 à 16 µm) est constituée de mycéliums.

Mélanges de *K lactis* et de *G candidum*

Quelles que soient les proportions de chaque espèce dans le mélange, la concen-

tration totale en cellules et leur distribution «réelles» sont du même ordre de grandeur que les valeurs «calculées». Les résultats donnés dans le tableau V sont représentatifs de l'ensemble des essais. Pour les mélanges de *G candidum* G36 et de *K lactis* 44_g, il existe 2 populations différenciables, l'une de cellules isolées de diamètre 2-4 µm et l'autre de particules de diamètre 10-14 µm (fig 4a). Cependant, la population de diamètre 2-4 µm ne peut pas être assimilée uniquement à celle de *K lactis*, puisqu'elle est composée de la totalité des cellules de *K lactis* et d'une partie de celles de *G candidum* (articles mycéliens, cellules «ovoïdes»). En revanche, la totalité de la population de diamètre 10-14 µm n'est composée que de mycéliums ou de petits amas de *G candidum*. Les diamètres de *G candidum* G36 et de *K lactis* étant du même ordre de grandeur (2-5 µm), leur différenciation est impossible, et ce quelles que soient les proportions dans le mélange.

Au vu de ces essais, nous avons testé une autre souche de *G candidum* G48 dont les cellules sont «ovoïdes» et semblaient au microscope plus grosses que celles de *K lactis* 44_g. Dans le cas de mélanges de *G candidum* G48 et de *K lactis* en phase exponentielle de croissance (incubation ≤ 3 jours), les mêmes observations que celles des mélanges *G candidum* G36 et *K lactis* sont obtenues (tableau V). Dans le cas des cultures de plus de 3 jours, 3 populations sont mises en évidence (fig 4b). La première (diamètre 2-3 µm) est formée uniquement des cellules de *K lactis*, la seconde (diamètre 4-6 µm) est formée de cellules isolées de *G candidum* G48 et la dernière est formée des amas de *G candidum* G48. En effet, pour les cultures de 7 et 10 j, les proportions réelles de *G candidum* déterminées au compteur Coulter sont identiques aux erreurs près à celles prévues théoriquement; pour *K lactis*, les valeurs mesurées sont identiques à celles prévues (tableau V).

Tableau V. Numération des suspensions de *K lactis* et de *G candidum* en mélange à l'aide du compteur de particules.*Coulter Counter enumerations of G candidum and K lactis 44₈ in mixture before and after transpiration.*

Âge culture	Résultat	C (part/ml)	D ₁ (µm)	% C ₁	D ₂ (µm)	% C ₂	D ₃ (µm)	% C ₃
G candidum 2/ K lactis 1								
<i>G candidum G36</i>								
1 jour	Calculé	4,2.10 ⁷	2,0	100				
	Réel	4,1.10 ⁷	2,2	100				
2 jours	Calculé	9,1.10 ⁷	2,5	87	10,6	13		
	Réel	1,1.10 ⁸	2,3	89	10,6	11		
8 jours	Calculé	2,3.10 ⁸	2,5	95	13,3	5		
	Réel	2,0.10 ⁸	2,5	94	13,3	6		
15 jours	Calculé	2,2.10 ⁸	2,5	94	13,3	6		
	Réel	2,2.10 ⁸	3,0	94	13,3	6		
20 jours	Calculé	2,6.10 ⁸	3,0	94	13,3	6		
	Réel	2,4.10 ⁸	3,0	94	13,3	6		
<i>G candidum G48</i>								
3 jours	Calculé	1,7.10 ⁸	2,1	66	5,0	34		
	Réel	1,6.10 ⁸	2,1	66	5,0	34		
7 jours	Calculé	1,7.10 ⁸	2,1	36	5,5	49	6,5	17
	Réel	1,8.10 ⁸	2,1	36	5,5	47	6,5	15
10 jours	Calculé	2,0.10 ⁸	2,1	38	5,5	37	6,8	25
	Réel	1,9.10 ⁸	2,1	38	5,5	39	6,8	24

Les résultats présentés sont représentatifs de l'ensemble des essais. C : concentration totale déterminée avec le compteur de particules (particules/ml) ; D₁ : diamètre moyen de la 1^{re} population (µm) ; %C₁ : proportion de la 1^{re} population par rapport à la population totale ; D₂ : diamètre moyen de la 2^e population (µm) ; %C₂ : proportion de la 2^e population par rapport à la population totale ; D₃ : diamètre moyen de la 3^e population ; %C₃ : proportion de la 3^e population par rapport à la population totale. «Calculé» désigne les valeurs obtenues par calcul à partir des valeurs des 2 cultures pures et «Réel» les valeurs obtenues après mélange réel des 2 cultures pures.

C, total cell concentration obtained by Coulter Counter (particles/ml) ; D₁, average diameter for the 1st population of cells (µm) ; %C₁, percentage of 1st population in the total population ; D₂, average diameter for the 2nd population of cells (µm) ; %C₂, percentage of 2nd population in total population ; D₃, average diameter of the 3rd population (µm) ; %C₃, percentage of 3rd population in the total population. 'Calculé' are values estimated by computing from the ones of the single cultures and 'Réel' are values obtained after real mixture of *G candidum* and *K lactis* mixtures. These results were representative of all tests.

Fig 4a. Exemple de courbes de distribution obtenues sur *G. candidum* G36 et *K. lactis* 44g en culture pure ou en mélange (1/1) avec la méthode de numération au compteur de particules de type Coulter. Cas de cultures de surface incubées 7 jours à 25°C. D1 et D2 sont respectivement le diamètre moyen de la 1^{re} population de cellules et de la 2^e population. **b.** Exemple de courbes de distribution obtenues sur *G. candidum* G48 et *K. lactis* 44g en culture pure et en mélange (1/1) avec la méthode de numération au compteur de particules de type Coulter. Cas de cultures de surface incubées 7 jours à 25°C. D1, D2 et D3 sont respectivement le diamètre moyen de la 1^{re}, de la 2^e, et de la 3^e population de cellules.

a. Example of distribution curves of *Geotrichum candidum* G36 and *Kluyveromyces lactis* 44g in single culture or in mixture (1/1) obtained with Coulter Counter enumeration. D1 and D2 are respectively first and second cell population average diameter (surface cultures incubated 7 days at 25°C). **b.** Example of distribution curves of *Geotrichum candidum* G48 and *Kluyveromyces lactis* 44g in single culture or in mixture (1/1) obtained with Coulter Counter enumeration. D1, D2 and D3 are respectively first, second and third cell population average diameter (surface cultures incubated 7 days at 25°C).

Quels que soient les pourcentages des mélanges, le comptage différentiel de toutes les cellules de *G. candidum* et de *K. lactis* est donc possible seulement si les diamètres moyens de leurs populations sont suffisamment séparés.

DISCUSSION ET CONCLUSION

En ce qui concerne la transparisation, nous supposons que si elle est parfaitement efficace aussi bien sur les caillés purement lactiques que sur ceux purement présures, elle le sera également sur les caillés mixtes (présure et lactique). Quel que soit le type de caillé, le réactif de transparisation le plus efficace est celui de Driehuis et Teernstra (1992) modifié (pH = 12).

L'efficacité de ce réactif est fonction de la température, du temps de contact réactif/caillé et du type de caillé. Il semble être plus efficace sur les caillés présures que sur les caillés lactiques. En effet, une grande différence d'efficacité de transparisation est observée lorsqu'elle est suivie par absorbance. Cependant, au compteur Coulter, pour les particules de caillé lactique de diamètre supérieur ou égal à 2 µm, nous remarquons qu'il faut 30 min de contact réactif/caillé à 37°C pour obtenir une transparisation égale à celle des caillés présures pour lesquels elle est totale en 15 min à 25°C comme à 37°C. Quel que soit le type de caillé, pour les particules de diamètre inférieur à 2 µm, la transparisation n'est jamais totale puisqu'il reste des particules insuffisamment solubilisées dont l'absorbance est plus ou moins importante, ce qui explique les efficacités de transparisation observées par absorbance. Ces corpuscules insolubles sont des particules de caillé et/ou des bactéries lactiques.

La présence des bactéries lactiques permet d'expliquer la différence de transparisation observée entre caillés lactiques et caillés présures. En effet, nous remarquons

que les bactéries lactiques sont plus ou moins sensibles au réactif suivant les conditions de transparisation utilisées. Les numérations au compteur Coulter permettent de vérifier qu'il y a davantage de cellules bactériennes détruites lorsque la température de transparisation et/ou le temps de contact réactif/caillé augmentent. Cela a également été constaté dans le cas de cultures réalisées sur du lait par Kouomegne *et al* (1984) et Driehuis et Teernstra (1992). En outre, ces auteurs montrent que la désintégration des bactéries est très rapide et quasiment totale après 20 min de contact et qu'elle est précédée d'une phase de modification profonde des cellules, celles-ci devenant très boursouflées avant d'éclater.

Les meilleures conditions de transparisation des caillés par le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) modifié sont 37°C pour un temps de contact de 30 min. Cette transparisation n'étant pas totale, elle n'est donc pas utilisable pour mesurer la concentration microbienne totale par la méthode d'absorbance. En revanche, elle est suffisamment efficace pour compter les cellules microbiennes de diamètre supérieur ou égal à 2,0 µm.

En conclusion, pour transparer les suspensions de fromage à pâte molle, nous utiliserons le réactif de Driehuis et Teernstra (1992) à pH 12 à une température de 37°C et un temps de contact réactif/caillé de 30 min.

Nous avons supposé qu'en présence ou en absence de fromage, le réactif de transparisation agira de façon similaire sur les cellules microbiennes, même si un phénomène de protection des cellules peut exister lorsqu'elles sont en mélange avec des caséines ou des lipides. En conséquence, l'action du réactif de transparisation sur des suspensions de levures obtenues à partir de cultures en milieu liquide ou de surface a été étudiée en absence de fromage.

Trois méthodes ont été testées pour déterminer la concentration totale en cellules (cellules viables + non-viables) de cultures pures de levures après traitement avec

le réactif de transparisation utilisé à 37°C pendant 30 min.

Le réactif de transparisation entraîne la mort de la quasi-totalité des cellules de levures. Cela est dû en partie à la perméabilisation des membranes microbiennes par le Triton X100 (Miozzari *et al*, 1978). Mais il est impossible de les peser, non seulement parce que la transparisation entraîne une perte de matériel cellulaire, mais surtout parce qu'une augmentation non reproductible du poids sec est observée, même après lavages et centrifugations. Cela est vrai quels que soient la souche considérée ou le temps de contact réactif/cellules. Cette augmentation de poids cellulaire est certainement due à la destruction partielle de l'enveloppe cellulaire par le réactif et à la fixation de ce dernier sur ou dans les cellules (Miozzari *et al*, 1978). Kouomegne *et al* (1984) et Driehuis et Teernstra (1992) ont noté une action similaire de pénétration et de fixation du réactif dans les cellules de bactéries lactiques ainsi que le départ du contenu cellulaire dans le soluté.

En conclusion, cette méthode ne permet pas de mesurer la concentration totale en cellules des cultures pures. Elle ne le permettra donc pas *a fortiori* pour les mélanges existant en surface des fromages. Cependant, contrairement aux bactéries lactiques, les cellules de levures ne sont pas désintégrées et gardent leur forme générale. Elles sont donc comptables au compteur Coulter ou au microscope.

La concentration totale en cellules des cultures de levures, avant et après transparisation, peut être déterminée par mesure de l'absorbance à 650 nm. Quels que soient l'âge et le type de culture, pour chaque souche, une perte reproductible de turbidité cellulaire (20 à 30%) des cultures traitées est observée. Le réactif de transparisation semble donc être moins dommageable pour les levures que pour les bactéries lactiques pour lesquelles la diminution de turbidité

reproductible est de 40 à 100% selon les souches (Driehuis et Teernstra, 1992).

La détermination turbidimétrique de la quantité de matière donne donc des résultats satisfaisants dans le cas de cultures de souches pures de levures, à condition d'appliquer un facteur de correction si elles ont subi le traitement de transparisation. Mais, pour les mélanges tels que ceux existant en surface des fromages, l'estimation de la concentration totale en levures par détermination turbidimétrique de la matière sèche est difficilement utilisable. En effet, l'absorbance mesurée est fonction de la souche, de la taille et de la forme des cellules, de sorte qu'il y aurait interférence avec les autres micro-organismes, en particulier avec les levures. De plus, les proportions des différentes espèces évoluent avec le temps d'affinage (Lenoir *et al*, 1985) rendant irréalisable l'estimation d'une perte de turbidité moyenne par transparisation de sorte que même une quantification globale des levures par cette méthode est impossible. Cela est d'autant plus vrai que dans le cas des fromages à coagulation mixte, l'absorbance du caillé même après transparisation risque de ne pas être négligeable d'après ce qui a été vu dans ce qui précède. Il faudrait aussi vérifier que toutes les bactéries présentes se lysent effectivement comme les bactéries lactiques déjà testées pour ne pas interférer avec les levures.

La seule méthode qui reste applicable est le dénombrement des cellules des levures au compteur de particules Coulter, puisque la transparisation n'entraîne pas une désintégration de ces cellules, contrairement à celles des bactéries lactiques et qu'elle permet en revanche de solubiliser toutes les particules fromagères de diamètre supérieur à 2 μm . De plus, contrairement au cas des bactéries lactiques (Kouomagne *et al*, 1984), pour les levures, le traitement de transparisation provoque la diminution de la taille des amas et le détachement des articles mycéliens, ce qui constitue un avantage pour le comptage des cellules. En

accord avec Macauley *et al* (1976), Strunk *et al* (1976) et Ginn *et al* (1977), le résultat du dénombrement établi avec le compteur de particules est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec une cellule de Thoma (méthode de référence) après correction des cellules restant en amas ou des bourgeons.

Le compteur de particules permet donc de dénombrer la concentration totale des cultures pures de levures, leur diamètre équivalent et leur distribution avant et après transparisation. Après transparisation, la concentration totale en levures est supérieure à celle de la culture «témoin» et une diminution du diamètre moyen, fonction de la souche et de la morphologie des cellules, est observée. Cela s'explique par le détachement des bourgeons ou des articles mycéliens et/ou par la dissociation des amas. Pour une espèce à caractère polymorphe comme la plupart des espèces de *G. candidum*, cette méthode permet d'estimer la concentration totale en cellules mais aussi celle des différentes populations en présence. Dans le cas des mélanges de levures, nous pouvons aussi déterminer la concentration totale en cellules. Mais les concentrations des différentes espèces en présence ne peuvent être déterminées que si leurs diamètres équivalents sont suffisamment différents (différence $\geq 1 \mu\text{m}$).

Pour les mélanges microbiens plus complexes provenant de la surface des fromages, si nous posons comme hypothèse simplificatrice qu'après transparisation et homogénéisation avec l'Ultra-Turrax, les particules de diamètre équivalent inférieur à 2 μm comptées au Coulter sont des bactéries intactes ou non complètement désintégrées et des particules de fromage insuffisamment transparisées et que les particules supérieures à 20 μm sont des moisissures, la quantification des cellules de levures de diamètre compris entre 2 et 20 μm est alors possible.

En conclusion, dans le cadre de l'étude du comportement de mélanges microbiens simples tels qu'une levure + des bactéries, une levure + un *G. candidum* + des bactéries ou 2 levures de dimensions suffisamment différentes, la numération au compteur Coulter est utilisable pour suivre la quantité totale de cellules de levures et de *G. candidum* ainsi que celle des différentes espèces de levures en présence.

RÉFÉRENCES

- AFNOR NF 04-282 (1985) Fromages et fromages fondus, détermination de la matière sèche (méthode de référence). In : *Contrôle de la qualité des produits laitiers, analyses physiques et chimiques* (S. Amariglio, ed). 3^e éd. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 581-585
- Baruch DW, Meredith P, Jenkins LD, Simmons LD (1979) Starch granules of developing wheat kernels. *Cereal Chem* 56, 554-558
- Bourgeois CM, Mafart P (1991) Techniques globales d'évaluation de la microflore. In : *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, vol 3, Le contrôle microbiologique (Bourgeois CM, Leveau JY, eds). Tec & Doc Lavoisier APRIA, Paris, 50-71
- Chesworth SM, Dickinson E, Searle A, Stainby G (1985) Properties of oil in water emulsions containing gelatin and caseinate. *Lebensm Wiss u Technol* 18, 230-232
- Cornell DG, Pallansch MJ (1966) Counting and sizing fat globules electro-nically. *J Dairy Sci* 49, 1371-1375
- Driehuis F, Teerstra EJM (1992) Method for turbidimetric estimation of lactic acid bacteria in fat-containing milk. *Neth Milk Dairy J* 46, 209-215
- Ginn RE, Thompson DR, Packard VS (1977) Collaborative study of the Coulter counter-chemical method for counting somatic cells in raw milk. *J Food Prot* 40, 456-458
- Guéguen M (1984) Contribution à la connaissance de *Geotrichum candidum* et notamment de sa variabilité. Conséquences pour l'industrie fromagère. Thèse de Doctorat d'état ès sciences, Université de Caen, France, 471 p
- Guingamp MF, Humbert G, Choukri A, Linden G (1989) La transparisation du lait et des produits laitiers. *Tech Lait* 1036, 35-39
- Guiraud J, Galzy P (1980) L'examen au microscope. Partie I Techniques générales de la microbiologie. In : *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Éditions de l'usine nouvelle, Paris, Collection *Génie alimentaire*
- Hadley WK, Waldman F, Fulwyler M (1985) Rapid microbiological analysis by flow cytometry. In : *Instrumental methods for rapid microbiological analysis* (Nelson W, ed). Elsevier, New-York, 67-89
- Humbert G, Desnouveaux R, Linden G (1982) Applications de la dissolution totale des éléments colloïdaux du lait à la détermination de son activité protéasique. *Lait* 62, 427-434
- Kanasaki M, Breheny S, Hillier AJ, Jago GR (1975) Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. 1. A rapid method for estimation of bacterial populations in milk. *Aust J Dairy Technol* 30, 142-144
- Kouomegne R, Bracquart P, Linden G (1984) Application d'un réactif de transparisation du lait au dénombrement de bactéries. *Lait* 64, 418-435
- Kubitschek HE, Friske JA (1986) Determination of bacterial cell volume with the "Coulter" counter. *J Bacteriol* 168, 1466-1467
- Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol Bioeng Symp* 11, 641-649
- Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL, Tourmeur C (1985) La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* 41, 23-50
- Linden G, Humbert G, Kouomegne R, Guingamp MF (1987) Réactif pour rendre transparent des milieux biologiques et ses applications analytiques. *European Patent Application* 0246978
- Macauley DM, Ginn RE, Packard VS (1976) Experience in adaptation and comparative evaluation of the Coulter counter and direct microscopic somatic cell count (DMSCC) method for determining somatic cell counts in milk. *J Milk Food Technol* 39, 250-252
- Miozzari GF, Niederberger P, Hutter R (1978) Permeabilization of microorganisms by Triton X100. *Anal Biochem* 90, 220-233
- Notermans S, Heuvelman CJ, Beumer RR, Mas R (1986) Immunological detection of moulds in food: relation between antigen production and growth. *Int J Food Microbiol* 3, 253-261
- Piton C (1988) Évolution de la flore microbienne de surface de gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Lait* 68, 419-434
- Quinn JP, Patton AM, Marchant R (1981) Sporulation of *Geotrichum candidum* in submerged culture. *Trans Br Mycol Soc* 77, 627-635
- Saucedo-Casteneda G, Lonsane BK, Krishnaiah MM, Navarro JM, Roussos S (1992) Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii*. *Process Biotechnol* 27, 97-107
- Strunk DH, Timmel BM, Andreasen AA (1976) Alcoholic beverages: clarify evaluation of distilled alcoholic products with a particle counter. *J Assoc Off Anal Chem* 59, 671-674
- Surak JG, Matthews RF, Wang V, Padua HA, Hamilton RM (1979) Particle size distribution of commercial tomato juices. *Proc Flo State Hort Soc* 92, 159-163
- Wayne V, Peak S (1976) Lemon juice particulates. Some effects of juice processing. *J Agric Food Chem* 24, 825-828