

FSNVST

Département de Biologie

Module : Microbiologie appliquée et environnementale

Cycle : Master 2 Microbiologie appliquée

Chargée de module : Pr. GUETARNI H.

### **Tp1 : Cytométrie directe de *Saccharomyces cerevisiae***

1. **But :** Déterminer le nombre de cellules vivantes de *Saccharomyces cerevisiae* par comptage direct sur cellule de Malassez.
2. **Principe :** La levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour son rôle dans la fabrication de plusieurs aliments, notamment le pain et les boissons fermentées. La préculture de la levure joue un rôle essentiel dans ce processus de fermentation. Pour que la fermentation soit efficace, la préculture doit être suffisamment concentrée en levures : entre **1 à 2.10<sup>6</sup>** levures vivantes mL<sup>-1</sup>.

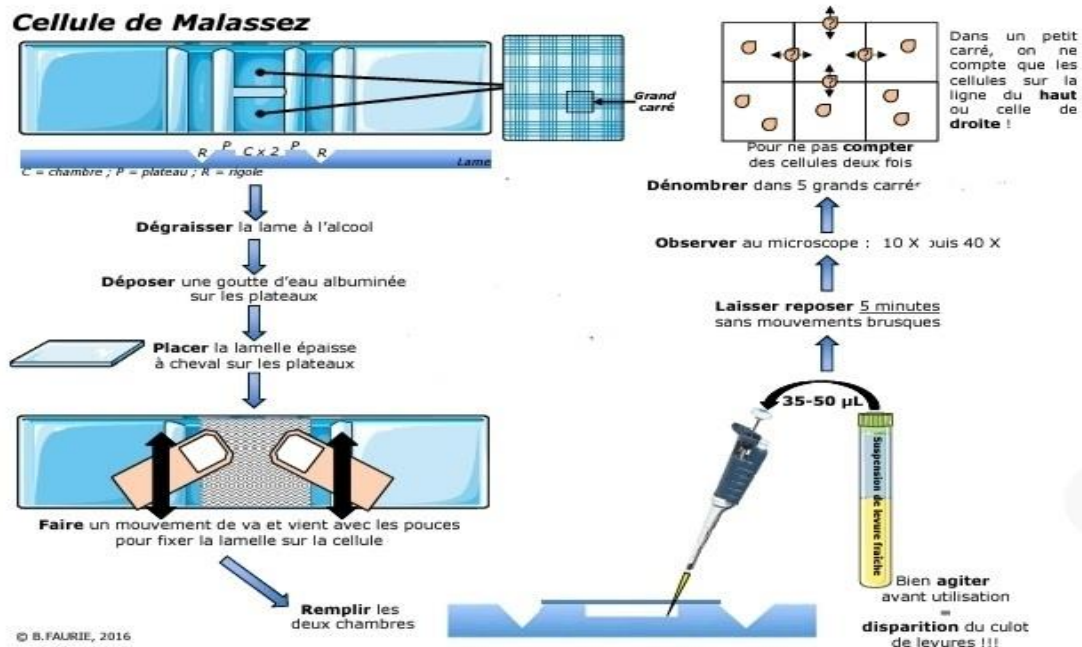
#### **3. Mode opératoire :**

1. Préparation de la cellule de Malassez : cette cellule est utilisée pour le comptage de cellules en suspension dans un liquide, l'hématimètre de Malassez est une épaisse lame de verre creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes. Entre la lamelle et la plate-forme centrale est créée une cavité qui recevra la suspension (  $V = p \times S$  dont **V** est le volume de suspension dans lequel les cellules sont comptées, **P** est la profondeur connue de l'hématimètre, **S** est la surface du quadrillage de la plate-forme centrale).

**N.B :** Le comptage doit être rapide, sans quoi la diminution du volume va entraîner une erreur importante du comptage suite à l'échauffement dû à l'exposition à la source de la lumière du microscope.

2. Homogénéiser soigneusement la préculture.
3. Dans un tube Eppendorf, introduire **100 µL** de préculture et **100 µL** de bleu de méthylène de Funk (les cellules vivantes rejettent ce colorant, les cellules mortes le gardent).
4. Homogénéiser doucement et soigneusement.
5. Remplir la cellule de Malassez avec la suspension réalisée.
6. Placer la cellule de Malassez sur la platine du microscope et laisser sédimenter 5 minutes.

7. Vérifier l'homogénéité de la répartition à l'objectif x 10.
8. Effectuer la numération (compter au moins 200 cellules) en comptant d'une part les cellules vivantes et d'autre part les cellules mortes.



2

Schéma représentatif des étapes de la cytométrie directe sur cellule de Malassez (modifié d'après la source : Faurie B. (2016). Cellule de Malassez. Technical Report).

#### 4. Travail à faire :

1. Déterminer le facteur de dilution  $F_d$  de la préculture en présence du bleu de Funk.
2. Présenter les valeurs mesurées du comptage dans un tableau (nombre de levures vivantes, nombre de levures mortes et le nombre total).
3. Calculer le pourcentage de levures vivantes.
4. Déterminer CN (la concentration en nombre de levures vivantes par  $\text{mL}^{-1}$  de préculture) en tenant compte du facteur de dilution.
5. Rédiger un compte-rendu en concluant si cette préculture pourrait mener à bien la fermentation.