

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

1^{er} JOUR

Durée de l'épreuve : 3 h30

Épreuve E5 - Unité U52

Techniques de microbiologie

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52
Techniques de microbiologie
1^{ER} JOUR

UTILISATION DES LACTOBACILLUS POUR LA
BIOPRÉSERVATION ALIMENTAIRE

L'addition volontaire de certains *Lactobacillus* dans un bioproduit alimentaire protège ce dernier en inhibant la croissance voire en provoquant une diminution de la population de certains micro-organismes pathogènes tels que, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella*. La biopréservation repose sur la compétition nutritionnelle et/ou sur la production de métabolites comme les bactériocines (peptides antimicrobiens de faible masse moléculaire et à forte activité antimicrobienne).

La caractérisation d'une nouvelle souche de *Lactobacillus* et des conditions de son utilisation en agro-alimentaire sont de la responsabilité des laboratoires R & D (Recherche et Développement).

Une des démarches suivies est de déterminer l'influence d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* sur le développement d'une souche pathogène « test » du genre *Salmonella*.

1 - Vérification succincte de l'appartenance de la « souche test » au genre *Salmonella*. (27 points)

1.1 - Protocole opératoire.

A partir de de la souche de *Salmonella* présentée sur gélose nutritive inclinée « S » ainsi qu'en bouillon nutritif ordinaire « S » :

Vérifier les caractères morphologiques.

**Présenter les examens microscopiques à un examinateur
accompagnés du compte rendu des observations.**

Réaliser le test enzymatique approprié.

Présenter la réalisation du test à un examinateur.

Vérifier les caractères biochimiques fondamentaux de genre suivants :

- Recherche de la fermentation du lactose.
- Recherche du type de fermentation du glucose (voie du butane-diol ou voie des acides mixtes).
- Recherche d'une uréase.
- Recherche de la production d'indole.
- Recherche de la tryptophane désaminase.
- Recherche de la lysine décarboxylase.

Proposer, dans le compte rendu, la liste des milieux nécessaires à ces recherches.

Faire viser la liste par un examinateur.

Ensemencer les milieux distribués.

Incuber à 37°C.

1.2 - Compte rendu.

Présenter les résultats de la vérification des caractères morphologiques ainsi que celui du test enzymatique. Commenter.

2 - Mise en évidence du pouvoir inhibiteur d'une nouvelle souche de *Lactobacillus* par la méthode des « tests à l'encontre ». (23 points)

2.1 - Présentation de la méthode des « tests à l'encontre ».

Une souche de *Lactobacillus* à tester est déposée dans des puits pratiqués dans l'épaisseur d'une gélose Mueller-Hinton.

Une seconde couche de gélose Mueller-Hinton, préalablement inoculée avec une souche pathogène, est ensuite déposée à la surface de cette préparation.

La présence d'une éventuelle activité inhibitrice se caractérise par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des puits.

2.2 - Matériel :

- 1 gélose Mueller-Hinton de 4 mm d'épaisseur.
- 1 tube à hémolyse à utiliser comme emporte pièce.
- 2 pointes de bois stériles.
- 1 culture de 24 heures de *Lactobacillus acidophilus* (« La ») en bouillon MRS.
- 1 pipette automatique P 1000 + cônes.
- 2 tubes à hémolyse contenant 1 mL de gélose MRS en surfusion.
- 1 tube contenant 10 mL de bouillon nutritif noté « BNO ».
- 1 culture de *Salmonella* (« S_t »).
- 1 tube contenant 5 mL de bouillon MRS stérile.
- 1 tube contenant 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion à 46°C.
- cuves de spectrophotomètre.
- 1 tube à essai stérile.

2.3 - Préparation de la « boîte test ».

Dans une gélose Mueller-Hinton de 4 mm d'épaisseur, pratiquer 3 puits à l'aide d'un tube à hémolyse utilisé comme emporte pièce.

Evider les puits en utilisant une pointe de bois stérile piquée obliquement dans la gélose.

Dans de la gélose MRS conservée en surfusion dans un bain thermostaté à 46°C, diluer au demi, la culture de *Lactobacillus acidophilus* notée « La » (volume final = 2 mL).

Placer cette dilution en attente dans le bain thermostaté à 46°C.

Remplir deux puits avec 250 µL de cette même dilution.

Prévoir un témoin négatif dans le troisième puits.

Laisser prédiffuser environ 20 minutes à la température du laboratoire.

2.4 - Réalisation de la double couche inoculée par *Salmonella*.

À partir de la culture en bouillon nutritif de *Salmonella* « S » fournie, préparer une suspension étalonnée à environ 0,12 unité de densité optique à $\lambda = 550$ nm.

On obtient « T' ».

Présenter la mesure opacimétrique de « T' » à un examinateur.

Incorporer 300 µL de « T' » à 8 mL de gélose Mueller Hinton conservée en surfusion au bain thermostaté à 46°C.

Homogénéiser manuellement en limitant la formation de bulles.

Verser **IMMEDIATEMENT** à la surface de la gélose Mueller Hinton.

Laisser solidifier.

Incuber 24 heures, sous 20 % de CO₂ et à 43°C.

2.5 - Compte rendu.

Justifier le choix de la solution choisie pour réaliser le « zéro » de l'opacimètre.

Justifier le choix du diluant nécessaire à la confection de « T' ».

Justifier la composition du témoin négatif.

3 - Evaluation de l'efficacité de la biopréservation dans le temps : réalisation d'un « challenge test ». (27 points)

Afin de vérifier si l'activité inhibitrice des *Lactobacillus* est conservée dans un produit alimentaire, des saucissons expérimentaux, préalablement ensemencés avec une souche de *Lactobacillus*, ont été contaminés par un inoculum de *Salmonella* quantitativement connu.

La quantité de *Salmonella* est alors suivie au cours du temps dans le cadre d'un « challenge test ».

3.1 - Matériel :

- Echantillon « E ».
- 3 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 4 pipettes stériles de 1 mL.
- 6 boîtes de Pétri stériles.
- 6 tubes contenant 15 mL de gélose lactosée au désoxycholate (gélose DL).

3.2 - Dénombrement de la population de *Salmonella* dans un saucisson expérimental, 28 jours après la contamination initiale.

Un saucisson expérimental de 100 g, préalablement ensemencé avec un ferment de biopréservation, a été contaminé par environ 10^6 UFC de *Salmonella*.

Ce saucisson contaminé est conservé 28 jours.

Au 28^{ème} jour, une masse de 10 g de ce saucisson expérimental a été déposée et broyée dans 90 mL d'eau peptonée, on obtient l'échantillon « E » fourni.

Réaliser un dénombrement des *Salmonella* présentes dans « E », 28 jours après l'inoculation.

Présenter la réalisation d'une dilution.

Procéder par inclusion dans la masse d'une gélose lactosée au désoxycholate, en testant en double, trois dilutions correctement choisies.

Incuber 24 h à 37°C.

3.3 - Compte rendu.

Choisir, en la justifiant, la gamme de dilutions permettant la réalisation du dénombrement. Pour cela, poser comme hypothèse que, dans le saucisson expérimental, la multiplication des *Salmonella* est peu probable du fait de la présence du ferment de biopréservation.

3 - Conclusion générale. (3 points)

Conclusion à envisager lors du deuxième jour après obtention des résultats.