

**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, respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

Pour une bonne réalisation de l'épreuve, une gestion optimale du temps imparti est nécessaire en fonction des temps d'incubation. Le candidat prendra soin de bien lire l'ensemble du sujet avant de commencer les manipulations.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

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

ANALYSES ET CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES DE LAITS

Le lait est un produit biologique d'origine animale dont la composition et les qualités nutritives en font un aliment presque complet et qui constitue une des premières sources nutritives de l'Homme.

Chez certains enfants en bas-âge cependant, on note une intolérance au lactose, ou une allergie aux protéines de lait de vache. Il est alors nécessaire d'avoir recours à des produits de substitution, à base de soja.

Dans l'industrie laitière, la maîtrise de qualité microbiologique est intégrée à la production, et se doit de répondre à des normes précises en termes de sécurité du consommateur et de prévention de l'altération des produits laitiers (Directive Européenne 93/43/CEE relative à « l'hygiène des denrées alimentaires » pour l'industrie agroalimentaire).

Au cours de cette étude, on se propose de :

- vérifier la qualité microbiologique, en fin de chaîne de production, de laits pasteurisés conditionnés.
- procéder à un contrôle microbiologique d'un produit de substitution du lait, suite à des cas d'intoxications alimentaires chez des enfants en bas-âge.

PARTIE 1 - ANALYSE D'UN LAIT PASTEURISÉ CONDITIONNÉ (52 points)

Au cours des différents procédés de transformation du lait, des contaminations peuvent survenir et être à l'origine d'intoxications alimentaires ou d'altérations du produit. Afin de limiter ces risques, on peut procéder à une pasteurisation du lait, dont l'efficacité doit être contrôlée. Par ailleurs, le lait contenant des antibiotiques ou des antiseptiques est impropre à la consommation humaine. C'est pourquoi, la réglementation européenne impose de contrôler l'absence de ces agents antimicrobiens dans le lait destiné à la vente.

Dans cette partie, trois lots différents de lait pasteurisé conditionné seront analysés :

- lait LP1 pour la recherche et le dénombrement d'une flore d'altération,
- lait LP2, pour le contrôle de l'efficacité de la pasteurisation,
- laits LP3 et LP4 pour la recherche de pénicilline.

1 - Recherche et dénombrement de la flore d'altération. (28 points)

1.1 - Matériel et réactifs :

- Lait pasteurisé référencé « LP1 » en tube à essai (dilution 10^0).
- 3 tubes à essai contenant 9 mL de milieu Tryptone-sel stérile.
- 8 tubes de 15 mL de gélose PCA + 1% de lait écrémé, en surfusion.
- 12 tubes de BLBVB simple concentration + cloche.
- 8 boîtes de Pétri stériles vides de 90 mm.
- 5 pipettes graduées stériles de 1 mL.

1.2 - Protocole opératoire.

1.2.1 - Préparation des dilutions du lait pasteurisé

Réaliser les dilutions décimales du lait LP1 jusqu'à 10^{-3} , en tryptone-sel.

↳ Réaliser une des dilutions décimales devant l'examinateur.

1.2.2 - Recherche et dénombrement de la flore aérobique mésophile (EN ISO 6610)

Ensemencer les dilutions 10^0 à 10^{-3} en masse dans la gélose « PCA + lait écrémé » (simple couche), en double essai.

Incuber à la température adéquate.

1.2.3 - Recherche et dénombrement des coliformes totaux (EN ISO 5541-2)

Cette technique ne sera pas réalisée par le candidat.

Les résultats correspondants seront présentés au jour 2.

1.2.4 - Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V-08-016)

Ensemencer 1mL des dilutions 10^0 à 10^{-3} en milieu BLBVB, en triple essai.

Incuber à la température adéquate.

↳ Préciser lisiblement sur les milieux, les températures d'incubation souhaitées.

1.3 - Compte rendu.

Justifier le choix des températures d'incubation des différents milieux : pour les recherches de la flore mésophile totale, des coliformes totaux et des coliformes thermotolérants.

2 - Contrôles de pasteurisation. (11 points)

Le lait LP2 a été pasteurisé à 75°C pendant 15 secondes (pasteurisation haute).

2.1 - Épreuve de la phosphatase alcaline :**2.1.1 - Matériel et réactifs :**

- Lait pasteurisé référencé « LP2 » en tube à essai.
- Lait bouilli référencé « Bouilli » en tube à essai.
- Réactif noté « R » de composition :
 - 4-nitrophényl-phosphate disodique : 0,15 g ;
 - tampon pH = 10,6 :
 - carbonate de sodium : 3,5 g,
 - hydrogénocarbonate de sodium : 1,5 g,
 - eau distillée stérile qsp 1L.
- 2 tubes à essai stériles.
- 1 pipette graduée stérile de 5 mL.
- 2 pipettes graduées stériles de 1 mL.
- Bain thermostaté à 37°C et chronomètre.

2.1.2 - Protocole opératoire.

Introduire dans 2 tubes à hémolyse notés **A** et **B**, 5 mL de réactif **R**.

Boucher les tubes et les porter 2 minutes à 37°C pour les préchauffer.

Dans **A** : ajouter 1 mL du lait à étudier (**LP2**).

Dans **B** : ajouter 1 mL de lait bouilli (**Bouilli**).

Mélanger et porter à 37°C.

Effectuer une lecture à 30 min et à 2 h. Le principe et le mode de lecture du test sont rappelés dans l'annexe 1.

2.1.3 - Compte rendu.

Quel est le rôle du tube B ?

Présenter les résultats.

Conclure sur la présence de la phosphatase alcaline.

2.2 - Épreuve de la peroxydase :**2.2.1 - Matériel :**

- Lait pasteurisé référencé « LP2 » en tube à essai.
- Lait cru référencé « LC » en tube à essai.
- Lait stérilisé UHT référencé « UHT » en tube à essai.
- Solution saturée de gaïacol, notée « Gaïacol ».
- Solution de H₂O₂ à 900 mmol/L (10 volumes) présentée en compte-gouttes.
- 3 tubes à essai stériles.
- 4 pipettes graduées stériles de 2 mL.

2.2.2 - Protocole opératoire.

Introduire dans 3 tubes à essai notés C, D, E :

- dans **C** : 2 mL de lait **LP2** ;

- dans **D** : 2 mL de lait **LC** ;

- dans **E** : 2 mL de lait **UHT**.

Introduire dans les 3 tubes :

- 2 mL de solution saturée de gaïacol (**Gaïacol**) ;

- 1 goutte de H₂O₂ à 900 mmol/L.

Agiter et garder les tubes dans la main (20-30°C) pendant 1 min.

Observer la coloration. Le principe et le mode de lecture du test sont rappelés dans l'annexe 1.

2.2.3 - Compte rendu.

Quel est le rôle des tubes D et E ?

Présenter les résultats.

Conclure sur la présence de la peroxydase dans le lait LP2.

D'après les résultats obtenus en 2.1. et 2.2., et l'analyse de la courbe présentée en annexe 2, établir une conclusion générale sur la pasteurisation du lait LP2.

3 - Recherche de pénicilline dans du lait par la méthode de confirmation sur milieu gélosé. (13 points)

L'analyse est prévue en deux étapes :

1. Détection sommaire par la technique d'acidification en lait.
2. Méthode de confirmation selon la norme NF V-21-012, pour les échantillons positifs ou douteux au premier test.

Seule l'étape 2 sera réalisée.

3.1 - Matériel et réactifs :

- Lait référencés « LP3 » et « LP4 » en tube à essai.
- Culture jeune de *Bacillus stearothermophilus calidolactis*, ensemencée en Bouillon Nutritif (bactérie test sensible à la pénicilline), référencée « BSC ».
- 5 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion.
- Solution de pénicillinase à 1000UI.cm⁻³, notée « P-ase ».
- Disque de pénicilline à 10 UI (6 µg).
- 4 disques de papier-filtre stérile (diamètre 9mm).
- 1 boîte de Pétri stérile vide de 90 mm.
- 1 pipette graduée stérile de 1 mL.
- Lames de verre.
- 3 pipettes Pasteur stériles.

3.2 - Protocole opératoire.**3.2.1 - Ensemencement de la souche test.**

Introduire 1 mL de culture jeune de la bactérie test dans 5 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion. Homogénéiser.

Couler dans une boîte de Pétri stérile.

Laisser prendre en masse.

3.2.2 - Préparation des disques.

Déposer les 4 disques de papier-filtre sur les lames stériles.

Imbiber chaque disque en respectant le protocole suivant :

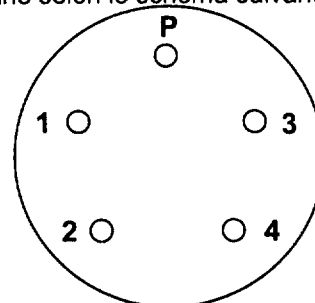
	Disque 1	Disque 2	Disque 3	Disque 4
Lait à étudier LP3	1 goutte	1 goutte		
Lait à étudier LP4			1 goutte	1 goutte
Solution de pénicillinase P-ase		1 goutte		1 goutte

Égoutter.

3.2.3 - Réalisation du test.

Déposer les 4 disques imbibés et le disque de pénicilline selon le schéma suivant :

1	Disque 1
2	Disque 2
3	Disque 3
4	Disque 4
P	Disque de Pénicilline



Incuber à 55°C pendant 24 h en chambre humide.

3.3 - Compte rendu.

Justifier les conditions d'incubation.

PARTIE 2 - CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE D'UNE PRÉPARATION POUR L'ALIMENTATION DES ENFANTS EN BAS-ÂGE (28 points)

La Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) a mis en évidence, chez des enfants en bas-âge, une origine commune entre différents cas d'intoxication alimentaire, suite à la consommation d'un produit de substitution du lait à base de soja. Un contaminant bactérien a été isolé, à partir d'un prélèvement effectué au niveau des tours d'atomisation de la chaîne de production.

On se propose de réaliser une des étapes du protocole officiel de la recherche d'un contaminant dans une poudre déshydratée.

Identification d'un contaminant dans une poudre déshydratée à base de soja :

1 - Matériel et réactifs :

- Souche présumée contaminante, isolée sur TSA, référencée « S ».
- 1 tube d'eau distillée stérile.
- Réactifs pour tests enzymatiques.
- Matériel pour coloration de frottis.
- Milieux àensemencer **distribués 1 h avant la fin de l'épreuve.**
- 1 tube à hémolyse stérile.
- Pipettes Pasteur stériles.
- Lames de verre et lamelles.

2 - Protocole opératoire.

2.1 - Réaliser un examen microscopique et le test enzymatique nécessaire pour l'orientation de l'identification.

↳ **Présenter l'observation microscopique à l'examineur accompagné du compte-rendu de l'observation.**

↳ **Effectuer le test enzymatique en présence de l'examineur.**

2.2 - Proposer par écrit dans l'**annexe 3**, le choix de la microgalerie et des milieux complémentaires àensemencer pour identifier la souche.

↳ **Le choix de la galerie écrit doit être rendu au plus tard 1h avant la fin de l'épreuve, heure à laquelle les milieux seront distribués.**

2.3 - Ensemencer les milieux fournis.

3 - Méthodologie.

Ce contaminant peut être dénombré sur gélose VRBG.

Rappeler les caractères principaux de la famille suspectée après ces analyses.

Analyser la composition du milieu VRBG.

<u>VRBG</u>	
- Peptone	5 g
- Extraits de viande	5 g
- Glucose	5 g
- Désoxycholate de sodium	1,5 g
- Cristal violet	2 mg
- Rouge neutre	5 g
- Chlorure de sodium	5 g
- Agar	15 g
pH = 6,8	

Préciser l'allure des colonies suspectes sur ce milieu, et le justifier.

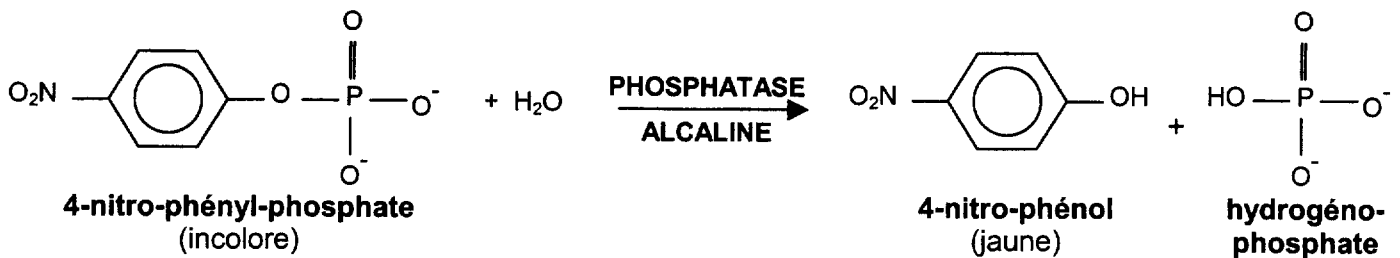
ANNEXE 1 : CONTRÔLES DE PASTEURISATION

1. Épreuve de la phosphatase alcaline : technique d'Aschaffensurg et Muellen.

1.1. Principe.

La présence de l'activité phosphatase alcaline est révélée par l'utilisation d'un substrat incolore, qui après action de l'enzyme, donne un produit coloré.

Le substrat utilisé est le 4-nitro-phényl-phosphate disodique (incolore) qui est hydrolysé en présence de la phosphatase alcaline en 4-nitro-phénol (jaune) et hydrogénophosphate selon la réaction suivante :



1.2. Lecture et Interprétation.

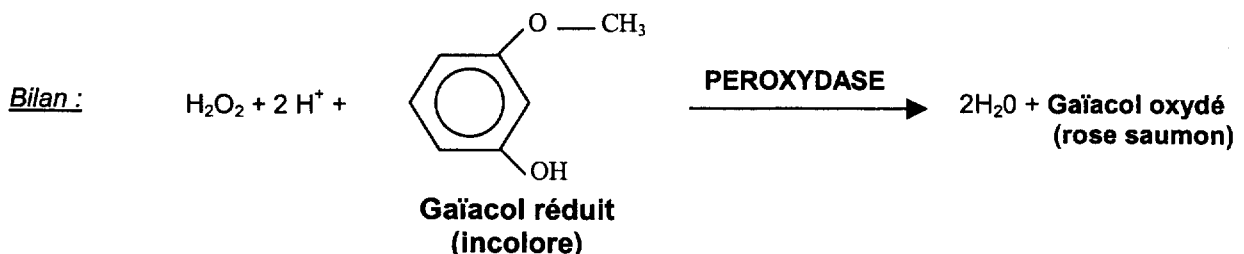
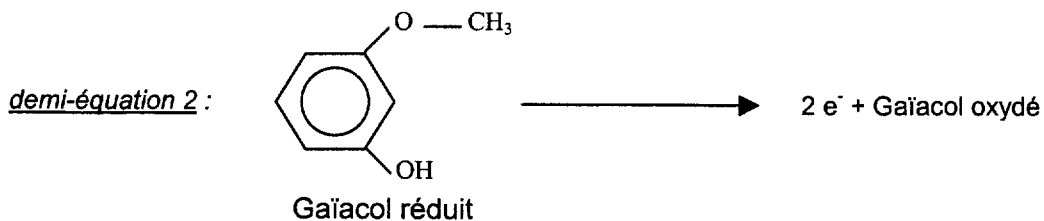
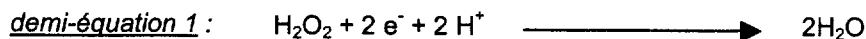
Une coloration jaune traduit la présence de l'activité phosphatase alcaline (réaction positive).

2. Epreuve de la peroxydase : réaction de Dupouy.

2.1. Principe.

La présence de la peroxydase est révélée par l'utilisation d'un réducteur organique incolore qui, après action de l'enzyme, donne un composé oxydé coloré.

La réaction catalysée est le transfert d'électrons du gaïacol réduit (réducteur organique incolore) sur le peroxyde d'hydrogène, aboutissant à la formation du gaïacol oxydé (rose saumon) selon la réaction suivante :



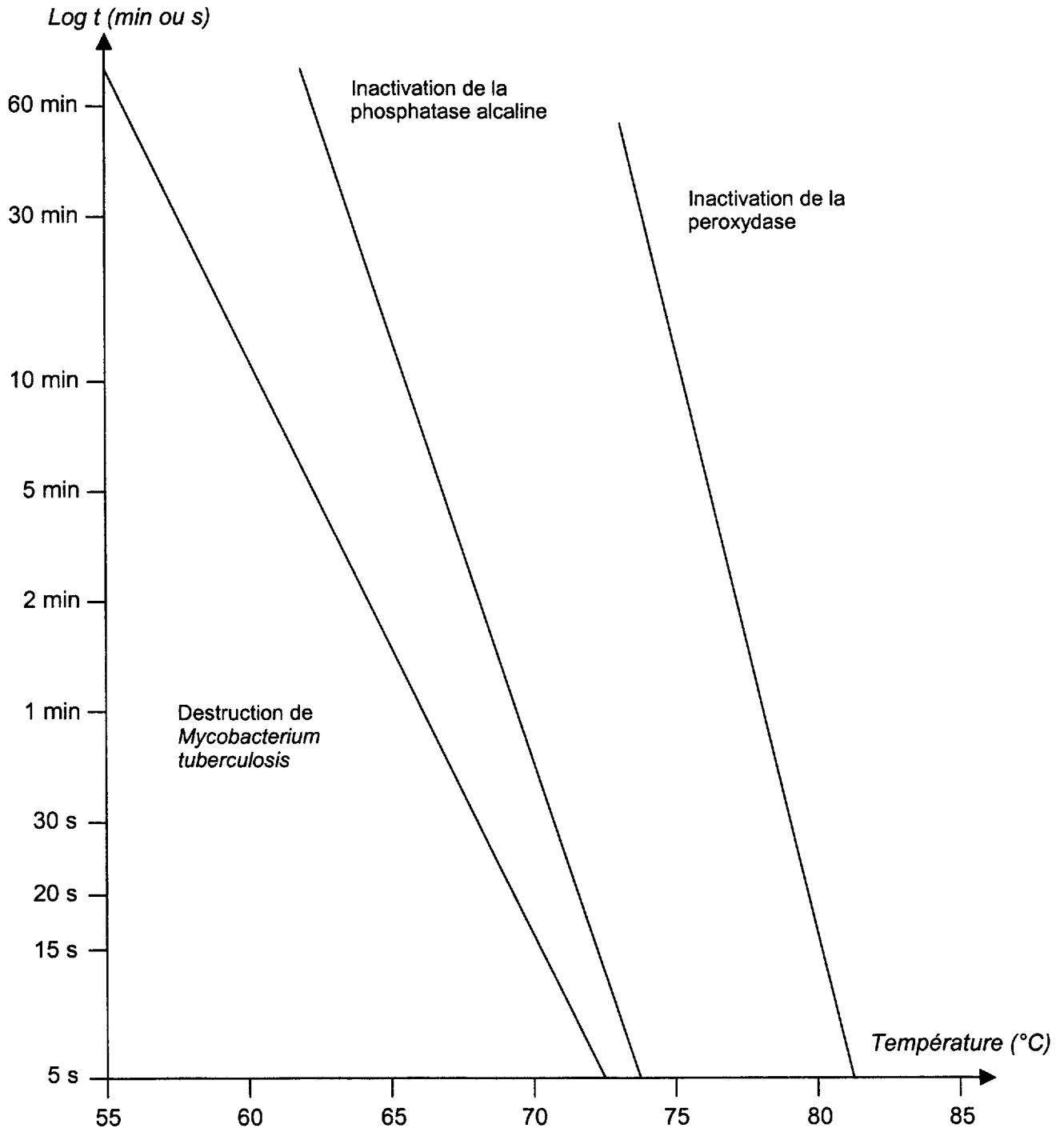
2.2. Lecture et Interprétation.

Une coloration rose saumon traduit la présence de l'activité peroxydase (réaction positive).

ANNEXE 2 : CONTRÔLES DE PASTEURISATION

Diagramme de Pasteurisation, représentant les couples de valeur « température - durée de chauffage » pour lesquels il y a :

- destruction de *Mycobacterium tuberculosis*
- inactivation de la phosphatase alcaline
- inactivation de la peroxydase



Adapté du livre : « Contrôles du Lait et des Produits Laitiers – Bactéries Lactiques », CRDP Dijon

Académie :	Session :
Examen ou Concours	Série* :
Spécialité/option* :	Repère de l'épreuve :
Épreuve/sous-épreuve :	
NOM :	
<i>(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)</i>	
Prénoms :	N° du candidat <input type="text"/>
Né(e) le :	<i>(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)</i>

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BAE5TM/4A

SESSION 2006

Page : 7/7

Coefficient : 4

ANNEXE 3 : FICHE DE COMMANDE DES MILIEUX À ENSEMENTER POUR L'IDENTIFICATION DU CONTAMINANT

À rendre 1h avant la fin de l'épreuve.

Référence du Candidat (numéro de poste) :

- **Aspect macroscopique :**

- **Orientation justifiée de la souche :**

- **Milieux commandés :**