

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

1^{er} JOUR

Durée de l'épreuve : 3 H15

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

CONTRÔLE QUALITÉ AU COURS DE LA FABRICATION
DE LA BIÈRE

La majorité des bières est élaborée à partir de grains d'orges germés, broyés et brassés. Le moût obtenu est stérilisé puis ensemencé avec une souche de levure du genre *Saccharomyces* pour effectuer une fermentation alcoolique.

Le laboratoire de microbiologie intervient à tous les niveaux du procédé de fabrication en contrôlant la viabilité des souches de levures dans la préculture et dans le moût.

Dans le cadre du contrôle de la qualité des milieux utilisés, on teste la sélectivité de l'antibiotique du milieu de dénombrement.

1 - Contrôle de la viabilité et numération du ferment avant inoculation du moût (21 points)

1.1 - Principe

Pour la fermentation alcoolique le volume d'inoculum doit être compris entre 5 et 10 % du volume total du moût et le nombre de levures doit être, en début de fermentation, compris entre $1,0 \cdot 10^6$ et $2,0 \cdot 10^8$ par mL.

Le contrôle de la viabilité et le dénombrement sont réalisés à partir d'une préculture de *Saccharomyces cerevisiae* notée « SC » en cellule de Malassez (**annexe 1**).

1.2 - Matériel et réactifs

- Préculture de *Saccharomyces cerevisiae* notée « SC » (5 mL).
- Spectrophotomètre.
- 3 cuves + parafilm.
- Bouillon Sabouraud (20 mL).
- 2 tubes à hémolyse stériles.
- Pipettes automatiques P₂₀₀, P₁₀₀₀ + cônes stériles.
- Bleu de Funk.
- Cellule de Malassez + lamelle.
- Pipette graduée de 5 mL.

1.3 - Protocole opératoire

Diluer en tube à hémolyse la préculture à 25% et **mesurer la densité optique à 620 nm en présence d'un examinateur**. Déterminer la concentration de la préculture « SC ».

1 unité de D.O à 620 nm correspond à $1,1 \cdot 10^7$ levures.mL⁻¹ à 620 nm

Dans un tube à hémolyse introduire 0,5 mL de la dilution précédente et 0,5 mL de Bleu de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez et effectuer la numération.

↳ **Réaliser en présence d'un examinateur la mise en cellule de Malassez puis présenter un champ microscopique en indiquant le nombre de cellules comptées dans un rectangle.**

1.4 - Compte-rendu

Donner les résultats bruts du comptage.

Calculer le pourcentage de viabilité et la concentration de levures viables par mL de préculture « SC ».

Déterminer le volume de préculture à introduire pour 1 litre de moût. Justifier le calcul.

Comparer et expliquer les résultats des concentrations « SC » obtenues avec la méthode spectrophotométrique et la numération en cellule de Malassez.

2 - Dénombrement des levures du moût après inoculation (19 points)

2.1 - Matériel

- Moût noté « M » (5 mL).
- 6 géloses au Rose Bengale + chloramphénicol précoulées.
- 8 tubes d'eau stérile (9 mL).
- 8 pipettes stériles de 1 mL ou système paille.
- Dispositif d'étalement stérile.

2.2 - Protocole opératoire

Un moût a été inoculé avec le volume de préculture calculé précédemment.

Vérifier la concentration des levures du moût « M » en réalisant un dénombrement en surface sur gélose au Rose Bengale et chloramphénicol (**annexe 2**).

Tester trois dilutions successives en double essais.

↳ **Montrer la réalisation d'une dilution à l'examinateur.**

2.3 - Compte-rendu

Justifier les dilutionsensemencées.

Préciser la durée et la température d'incubation.

3 - Vérification de la sélectivité de l'antibiotique du milieu de dénombrement (40 points)

La fiche technique du milieu de dénombrement au Rose Bengale et chloramphénicol fourni en **annexe 2** précise les souches microbiennes de référence à utiliser pour tester le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique.

3.1 - Matériel et réactifs

- Souche de référence « R » sur gélose nutritive inclinée.
- Réactif pour coloration de Gram.
- Eau oxygénée et réactif pour oxydase.
- Suspension « R1 » (souche « R » de 18 heures diluée au 1/100 en bouillon nutritif) (5 mL).
- 2 tubes d'eau physiologique stérile 5 mL.
- 5 tubes d'eau physiologique stérile (9 mL).
- 3 tubes à hémolyse stérile.
- Tube contenant 1 mL de solution de chloramphénicol à 0,2 g/L.
- Pipette automatique P₁₀₀₀ + cônes stériles ou système paille.
- 3 géloses Columbia.
- 10 oèses calibrées à 10 µL.

3.2 - Identification de la souche de référence

Réaliser le(s) examen(s) microscopique(s) et test(s) enzymatique(s) nécessaires à l'orientation de la souche.

↳ **Appeler un examinateur lors de la réalisation de ces examen(s) et test(s).**

Proposer sur l'**annexe 3** une galerie miniaturisée et les milieux nécessaires à l'identification du microorganisme (1 heure avant la fin de l'épreuve).

Ensemencer la galerie fournie par le centre.

3.3 - Mise en évidence de l'activité bactéricide du chloramphénicol

Dans un contexte de qualité il est nécessaire de contrôler l'activité anti-microbienne de l'antibiotique présent dans le milieu de dénombrement.

On considère que cette substance est bactéricide si son action provoque au moins une réduction de 99,99 % (4 réductions décimales) de l'inoculum initial de la souche de référence « R ».

Préparation des boîtes témoins.

Réaliser une dilution, notée « R2 », au 1/2 de la suspension « R1 » en eau physiologique stérile.

À partir de « R2 » effectuer une série de dilution jusqu'à 10⁻⁵ en eau physiologique stérile.

Sur deux géloses Columbia, réaliser à l'aide d'une oèse calibrée pour chaque dilution (de « R2 » à 10⁻⁵) une strie de 5 cm selon le gabarit de l'**annexe 4**.

Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Réalisation du test.

Introduire dans un tube à hémolyse stérile 1 mL de chloramphénicol à 0,2 g/L et 1 mL de « R1 ».

Mélanger et laisser en contact pendant 60 minutes à température ambiante puis réaliser à partir de ce test 3 stries identiques comme précédemment à la surface d'une gélose Columbia.

Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

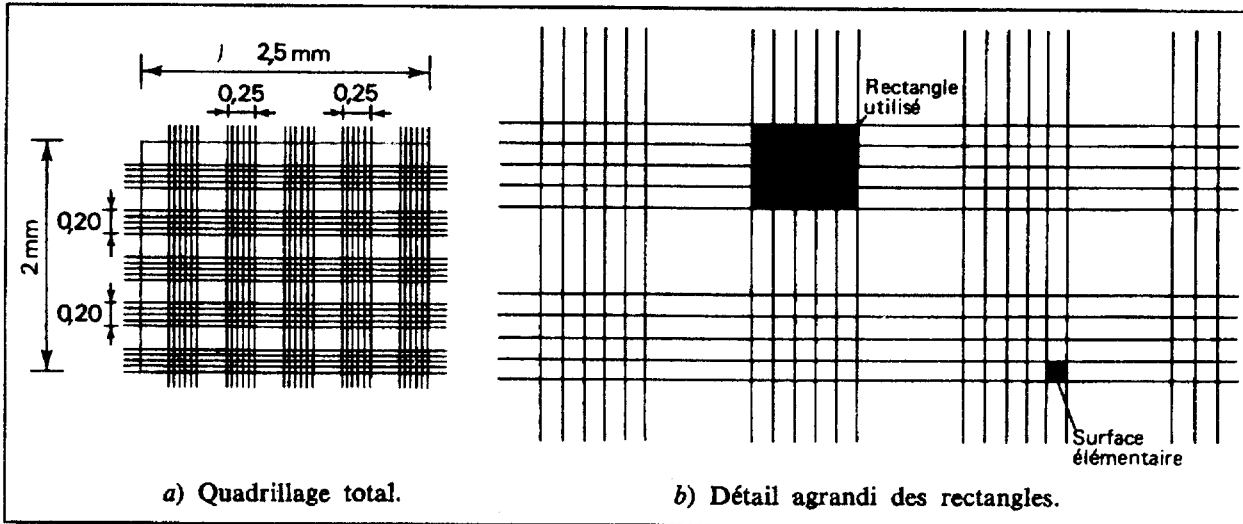
3.4 - Compte-rendu

Justifier la préparation de la suspension « R2 » ainsi que la dilution du témoin jusqu'à 10⁻⁵.

Justifier l'utilisation du chloramphénicol à la concentration de 0,2 g/L.

ANNEXE 1

CELLULE DE MALASSEZ



Quadrillage de Malassez utilisé pour la numération.

Caractéristiques de la cellule de Malassez

Profondeur	$0,2 \text{ mm} \pm 0,002 \text{ mm}$
Surface totale du quadrillage	5 mm^2
Volume total	1 mm^3
Surface des rectangles quadrillés	$1/20^{\text{e}}$ de mm^2
Volume correspondant aux rectangles quadrillés	$1/100^{\text{e}}$ de mm^3 soit $1/100^{\text{e}}$ du volume

ANNEXE 2**FICHE MILIEU GÉLOSE AU ROSE BENGAL****Formule-Type**

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone papainique de soja	5,0 g
- Glucose	10,0 g
- Phosphate monopotassique	1,0 g
- Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0,5 g
- Rose bengale	50 mg
- Chloramphénicol	0,1 g
- Agar agar bactériologique	13,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

Contrôle Qualité

- Milieu déshydraté : poudre crème à rosâtre, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose rose.
- Réponse culturale typique après 72 heures d'incubation à 25°C :

Microorganismes	Croissance
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC* 9763	bonne à excellente
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	bonne à excellente
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	bonne à excellente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	inhibée
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	inhibée

Stockage / Conservation

Milieu déshydraté : 2-30°C.

- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Milieu préparé (à titre indicatif) :

- Milieu en flacons : 3 mois à 2-8°C, à l'abri de la lumière.
- Milieu en boîtes : 7 jours à 2-8°C, à l'abri de la lumière.

Présentation

Milieu déshydraté :

- Flacon de 500 g : BK151HA

Références bibliographiques

- (1) Mossel, D.A.A., Vasser, M., and Mengerink, W.J.H. 1962. A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages. *Lab. Pract.*, **11**: 109-112.
- (2) Jarvis, B. 1973. Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food., *J. Appl. Bacteriol.*, **36**: 723-727.
- (3) Korbinger, J.A., and Rodgers, M.F. 1978. Single or multiple antibiotic-amended media to enumerate yeasts and molds. *J. Food Prot.*, **41**: 367-369.
- (4) Baggerman W.I. 1981. A modified rose bengal medium for the enumeration of yeasts and moulds from foods. *Eu. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**: 242-247.
- (5) MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, volume 1: 681-682.
- (6) Mistivec, P. B., L. R. Beuchat, and M. A. Cousin. 1992. Yeasts and Molds. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3^e Ed. American Public Health Assoc., Washington D.C: 239-249.

Préparation

- Mettre en suspension 29,7 g de milieu déshydraté (BK151) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à dissolution complète.
- Répartir à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Mode d'emploi

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance).
- Refroidir et maintenir à 47°C.
- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser ou de ses dilutions décimales dans les boîtes.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 20-25°C pendant 3 à 5 jours, à l'obscurité.

Lecture

Dénombrer séparément les levures et les moisissures.

Les colonies de levures apparaissent en rose en raison de l'assimilation du rose bengale. Les colonies de levures et de bactéries (non inhibées) pouvant être confondues, il est nécessaire de réaliser un test de confirmation au microscope.

DANS CE CADRE

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

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

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

Repère : BAE5TM/3A

SESSION 2008

Durée : 3 H 15

Page : 5/6

Coefficient : 4

ANNEXE 3

(à rendre avec la copie)

BON DE COMMANDE

Poste n°

▪ DESCRIPTION DES EXAMENS MICROSCOPIQUES :

▪ RÉSULTATS DES TESTS ENZYMATIQUES :

▪ DEMANDE DE LA GALERIE MINIATURISÉE ET MILIEUX :

NE RIEN ÉCRIRE

ANNEXE 4

GABARIT DE RÉALISATION DES STRIES

