



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

Campagne 2009

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E3 - Unité U32

Microbiologie et technologies d'analyse

Calculatrice autorisée.

Dictionnaire anglais-français autorisé.

ÉPREUVE E3. UNITÉ U32**Microbiologie et technologies d'analyse****ANALYSES ET CONTRÔLES DES SALAISONS**

Une entreprise de charcuteries de type salaison cherche à contrôler la fabrication de ses produits depuis l'achat des matières premières jusqu'au produit fini après la mise en place d'une démarche HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*).

Le diagramme de fabrication du salami est présenté dans le **document 1**.

Des contrôles microbiologiques sont effectués à différents niveaux de la chaîne de production :

- atmosphère de l'atelier ;
- eau de lavage des boyaux ;
- couteaux trancheurs ;
- viande de porc à la réception ;
- ferments ;
- produit fini (salami tranché et emballé).

On se propose d'analyser les résultats obtenus pour chacun de ces contrôles puis d'en effectuer le bilan.

1 - Contrôle d'hygiène dans l'atelier de fabrication. (34 points)**1.1 - Contrôle de l'aérobiocontamination des locaux (document 2). (4 points)**

1.1.1 - Donner le principe de fonctionnement d'un biocollecteur.

1.1.2 - Des prélèvements ont été réalisés dans deux zones de la chaîne de fabrication du salami.
Donner les résultats des prélèvements en pnc/m³ (particules donnant naissance à colonies).
Justifier le calcul.
Conclure.

1.2 - Contrôle de l'eau de lavage des boyaux. (7 points)

Les boyaux utilisés lors de l'embossage sont lavés et l'eau utilisée pour le lavage est analysée. Les coliformes dits « totaux » et les coliformes thermotolérants sont recherchés et dénombrés par la technique de filtration sur membrane.

1.2.1 - Expliquer l'intérêt de cette technique pour l'analyse de l'eau.

1.2.2 - Comment différencie-t-on pratiquement les deux types de coliformes ? Que peut-on conclure de la présence de coliformes thermotolérants dans l'eau ?

1.2.3 - On utilise pour cette recherche la gélose au TTC et Tergitol 7. La fiche technique du milieu est donnée dans le **document 3**. Expliquer le rôle des constituants du milieu.

1.2.4 - Indiquer l'aspect des colonies de coliformes sur ce milieu.

1.2.5 - Le nombre de colonies caractéristiques sur la gélose incubée à 37°C est de 30 pour 100 mL d'eau. Conclure quant à la qualité de l'eau.

1.3 - Contrôle des couteaux trancheurs. (23 points)

Ces couteaux sont utilisés essentiellement pour la découpe de la viande de porc lors de la préparation du salami avant emballage sous vide. Différentes analyses sont effectuées sur ce matériel :

- dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile (FAM) et des coliformes ;
- recherche des *Listeria*.

1.3.1 - L'analyse de la FAM et des coliformes est présentée dans le **document 4**.

1.3.1.1 - Donner l'intérêt de l'utilisation du neutralisant.

1.3.1.2 - Etablir la formule littérale du calcul utilisé pour obtenir les résultats présentés dans le tableau du **document 4** (soit le nombre N d'UFC/cm² en fonction du nombre m de colonies dénombrées sur les boîtes et de S, la surface analysée.).

1.3.1.3 - Conclure avec l'aide du **document 2**.

1.3.2 - Recherche des *Listeria*.

1.3.2.1 - *Listeria* se développe dans des conditions physico-chimiques particulières (température, pH et A_w). Expliquer pourquoi cette bactérie est capable de se développer dans les salaisons.

1.3.2.2 - Préciser en les justifiant les trois grandes étapes de la recherche de *Listeria* en analyse de routine.

1.3.2.3 - L'identification est généralement complétée par un sérotypage et un lysotypage. Définir ces termes.

1.3.3 - L'étude a montré la persistance de niches à *Listeria monocytogenes* sur les couteaux trancheurs. *Listeria monocytogenes* est responsable des toxi-infections d'origine alimentaire (TIA).

1.3.3.1 - Définir le terme TIA.

1.3.3.2 - La listériose touche, à l'intérieur d'une population, principalement des groupes d'individus à risques :

- les femmes enceintes
- les individus atteints de cancer ou d'infections virales
- les nourrissons et les personnes âgées.

Comment peut-on qualifier le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* ? Justifier votre réponse.

1.3.3.3 - Expliquer le mécanisme physiopathologique de *Listeria monocytogenes*.

1.3.4 - Les biofilms constituent la principale source de contamination dans les industries agro-alimentaires.

1.3.4.1 - Expliquer la formation de biofilm en mettant en évidence les structures bactériennes impliquées. On précisera la nature biochimique de chacune de ces structures.

1.3.4.2 - L'élimination des biofilms s'effectue selon un protocole bien établi utilisant successivement deux types d'agents chimiques. Indiquer les agents chimiques utilisés. Préciser leur mode d'action.

2 - Contrôle du procédé de fabrication. (20 points)**2.1 - Contrôle de la viande de porc à la réception et contrôle de l'entreposage de la viande congelée. (5 points)**

2.1.1 - La contamination initiale de la viande de porc au cours de l'abattage peut avoir deux origines : endogène et exogène.

Définir ce qu'on appelle flore endogène et flore exogène.

2.1.2 - Une analyse des microorganismes aérobies à 30°C de la viande de porc fraîche avant congélation a montré un taux de $2 \cdot 10^3$ UFC de microorganismes aérobies à 30°C par g et un taux de coliformes thermotolérants de 10 UFC par g.

A l'aide du **document 5**, conclure quant à la qualité microbiologique de la viande de porc vis-à-vis de ces critères.

2.1.3 - La viande de porc est ensuite congelée. Quel est l'intérêt de cette étape de congélation ?

2.2 - Contrôle des additifs. (4 points)

La viande est ensuite préparée, désossée et des additifs alimentaires sont additionnés.

2.2.1 - Addition de sel.

La teneur en sel du salami est de 2,5 %.

Outre ses conséquences sur le goût, l'addition du sel dans les aliments a divers autres effets. Rappeler ces effets.

2.2.2 - Des additifs alimentaires comme les nitrites sont ajoutés à raison de 0,1 g/kg de viande. Donner la principale raison, d'ordre microbiologique, qui justifie l'addition de nitrites aux salaisons.

2.3 - Contrôle de la fermentation. (7 points)

Les ferments de maturation pour salami sont composés de bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Pediococcus*), de staphylocoques et de microcoques pour la flore interne ainsi que de levures et de moisissures pour la flore de surface.

2.3.1 - Commenter les courbes fournies dans le **document 6** et en déduire le rôle de la flore lactique dans la fabrication du salami.

2.3.2 - Rappeler les caractères morphologiques et culturels de *Lactobacillus*.

2.3.3 - *Lactobacillus plantarum* est une bactérie homofermentaire. Ecrire l'équation bilan de la fermentation réalisée par cette souche.

2.3.4 - Une méthode de biologie moléculaire, l'électrophorèse en champ pulsé, combinée à l'utilisation d'enzymes de restriction à sites rares (R-ECP), a été utilisée afin d'identifier spécifiquement les souches inoculées comme ferments dans le salami (*Staphylococcus*, *Lactobacillus*) (voir **document 7**).

2.3.4.1 - Justifier l'utilisation du milieu MRS (Man Rogosa Sharp) en précisant ses conditions d'incubation.

2.3.4.2 - Commenter les résultats obtenus et conclure.

2.4 - Contrôle du produit fini. (4 points)

Une des analyses du produit fini (salami tranché et emballé) consiste à dénombrer les coliformes thermotolérants sur gélose VRBL. Ce dénombrement est réalisé à l'aide de l'ensemencement automatique dit « système spiral » suivant le protocole présenté **document 8**.

2.4.1 - Donner le nombre de coliformes thermotolérants/g de produit pour l'échantillon analysé. Justifier les calculs.

2.4.2 - Dans le cadre d'un contrôle selon un plan à trois classes, quatre autres échantillons ont été analysés.

Les résultats sont les suivants (en UFC/g) :

| E1 | E2 | E3 | E4 |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| $1,0 \cdot 10^2$ | $2,3 \cdot 10^3$ | $3,3 \cdot 10^3$ | $1,8 \cdot 10^2$ |

Conclure quant à la qualité bactériologique de ce lot de salami.

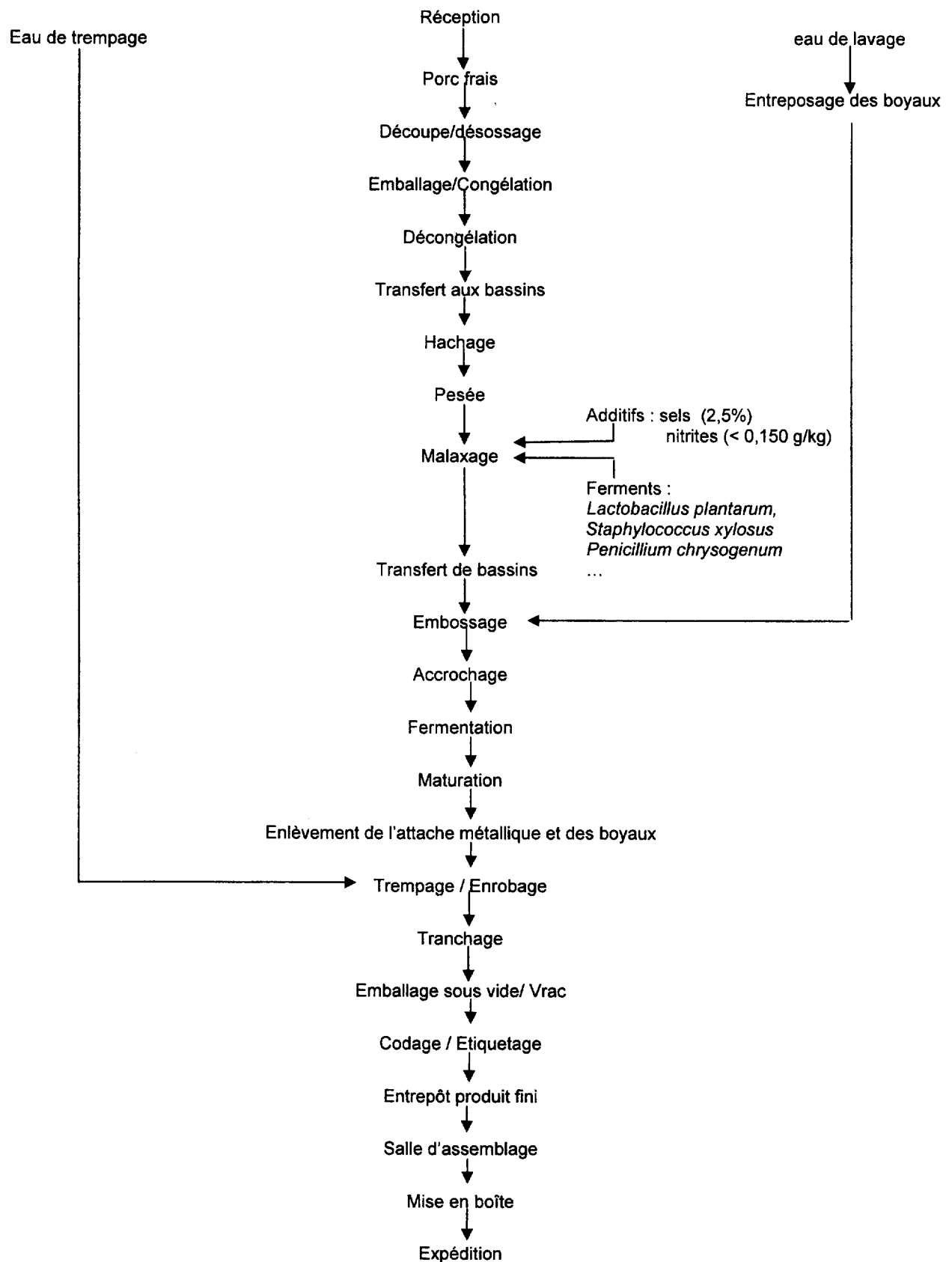
Données : $m = 1,0 \cdot 10^3$; $n = 5$; $c = 2$.

3 - Validation de la démarche HACCP. (6 points)

Après analyse de l'ensemble des résultats obtenus lors des contrôles réalisés en différents points de la chaîne de production, l'entreprise cherche à répondre aux problèmes rencontrés.

3.1 - A l'aide du **document 1**, localiser les points critiques en précisant les micro-organismes impliqués.

3.2 - Proposer ce qui pourrait être mis en œuvre dans la démarche HACCP pour améliorer la qualité microbiologique du produit fini.

DOCUMENT 1 : DIAGRAMME DE FABRICATION DU SALAMI

DOCUMENT 2 : CONTRÔLE DE L'AEROBIOCONTAMINATION

L'appareil de Casella - Bourdillon : l'air aspiré arrive verticalement, passe au travers de quatre fentes horizontales et frappe la surface d'un milieu gélosé contenu dans une boîte de Petri. La boîte est posée au-dessous des fentes sur une platine tournante à vitesse réglable, permettant une répartition uniforme des particules aériennes. L'appareil a des débits variables, allant de 30 à 700 L/min et peut collecter des particules de taille supérieure ou égale à 0,5 µm.

Résultats obtenus dans deux zones de la chaîne de fabrication du salami

| | Zone de réception de la viande (chambre froide) | Zone de tranchage |
|---|---|------------------------------------|
| Conditions de prélèvements | Débit : 60 L/min Temps : 4 min | Débit : 100 L/min Temps : 8 min |
| Résultats : nombre de colonies sur le milieu gélosé | 33 | 22 |

Classement des locaux en zones de sensibilité

Zone inerte (zone à risque faible ou moyen : niveau 1)

En général, le produit n'est pas en contact avec l'air (sauf pour les zones de cuisson). L'air distribué dans ce type de zone sera, si nécessaire, à température et hygrométrie contrôlées.

Les cas sont les suivants :

- zones de réception/stockage de matières premières (produits emballés ou en bacs) à basse température ;
- zones de réception/stockage des matières premières sèches (épices...) avec classement hygrométrique ;
- zones de cuisson ;
- zones d'emballage/encartonnage des produits préconditionnés.

L'air d'un local est considéré comme très propre à moins de 5 pnc/m³, et propre à moins de 100 pnc/m³ (pnc : particules donnant naissance à des colonies).

La biocontamination « normale » habituelle d'un endroit occupé est de 100 à 1 000 pnc/m³ ; au-dessus de 1 000 pnc/m³ l'air est fortement souillé.

Zone sensible (zone à risque élevé : niveaux 2 et 3)

En général, les opérations sur le produit sont réalisées à l'air libre dans des salles propres.

Il s'agit, en zone sensible, de classe d'empoussièrement, 350 000 et 3 500 000 (norme révisée Fédéral Standard 209 E, publiée en 1992).

• Niveau de risque 2

- **Contrôle de l'empoussièrement :**

→ 3 500 000 particules de 0,5 µm/m³ → moins de 350 pnc/m³ ;

- **Nettoyage et désinfection :**

→ ≤ 2 micro-organismes/cm² ;

Les cas sont les suivants :

ateliers de première transformation : abattage, chambres froides...

• Niveau de risque 3

- **Contrôle de l'empoussièrement :**

→ 350 000 particules de 0,5 µm / m³ → moins de 35 pnc/m³ ;

- **Nettoyage et désinfection :**

→ ≤ 0,2 micro organisme/cm².

Les cas sont les suivants :

ateliers de deuxième transformation : activités de découpes, de salaisons, confection de plats cuisinés de pâtisseries, de viennoiserie, surgélation.

DOCUMENT 3 :**Critères microbiologique de l'eau**

| | |
|---|----------|
| Bactéries aérobies revivifiables à 37°C | 20/mL |
| Coliformes totaux | 0/100 mL |
| Coliformes thermotolérants | 0/100 mL |
| Streptocoques D | 0/100 mL |
| Sporulés sulfito-réducteurs | 1/20 mL |

Gélose lactosée au TTC et Tergitol 7

La gélose de Chapman lactosée au T.T.C. et au Tergitol 7 est un milieu qui permet la recherche et le dénombrement des coliformes.
Elle est plus particulièrement utilisée pour la colimétrie des eaux, par la méthode des membranes filtrantes.

Formule
(en grammes par litre
d'eau distillée)

- Peptone bactériologique 10
- Extrait de viande 5
- Lactose 20
- Bleu de bromothymol 0,05
- Agar 12,75

PH final : 7,2 ± 0,2

Préparation
(déshydratée)

Mettre 47,8 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
Ajuster, si nécessaire, le pH à 7,2.
Répartir à raison de 100 ml par flacon de 150 ml, puis stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes.

Utilisation

Faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant, le ramener à la température de 45-50°C et ajouter à 100 ml :

- 5 mL d'une solution de chlorure de 2-3-5 triphényl-tétrazolium (T.T.C.) à 0,05 % en eau distillée ;
- 5 mL d'une solution de Tergitol 7 à 0,2 % en eau distillée.

Bien mélanger la base gélosée et les deux solutions, en évitant la formation de bulles.
Couler en boîte de Pétri stérile. L'épaisseur du milieu dans la boîte doit être d'au moins 5 mm. Les milieux ainsi répartis peuvent être conservés à + 4°C pendant 8 jours.

Au moment de l'emploi, sécher les boîtes à l'étuve à 37°C, couvercle ouvert, selon la technique habituelle.

Méthode des membranes filtrantes :

- Pour chaque échantillon à analyser, utiliser au moins deux membranes qui seront placées sur deux boîtes de milieu.

L'une est incubée à 37°C pendant 24 heures, l'autre à 44°C ± 1°C en atmosphère humide pendant 16 à 24 heures.

C.R.D.P.

75, cours Alsace et Lorraine
33075 BORDEAUX CEDEX
Tél. : 05 56 01 56 70

B.T.S. BIOANALYSES ET CONTRÔLES

DOCUMENT 4 : ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES D'UN TRANCHEUR**Procédure**

- Porter des gants et se désinfecter les mains à l'alcool juste avant le prélèvement.
- Ne toucher aucune surface avec la main du prélèvement.
- A l'aide d'une chiffonnette stérile, frotter la surface S à contrôler afin de décrocher un maximum de micro-organismes.
- Placer la chiffonnette dans un sachet stérile.
- Ajouter 1 mL de neutralisant et 9 mL d'eau peptonée.
- Passer au stomacher pendant 90 secondes.
- Faire les dilutions appropriées et ensemencer 1 mL dans la masse de gélose PCA (Plate Count Agar) ou VRBL (Violet Cristal, Rouge neutre, Bile et Lactose).
- Incuber les milieux PCA à 30°C pendant 48 h afin de dénombrer la flore microbienne totale.
- Incuber les milieux VRBL à 37°C pendant 24 heures pour dénombrer les coliformes totaux.

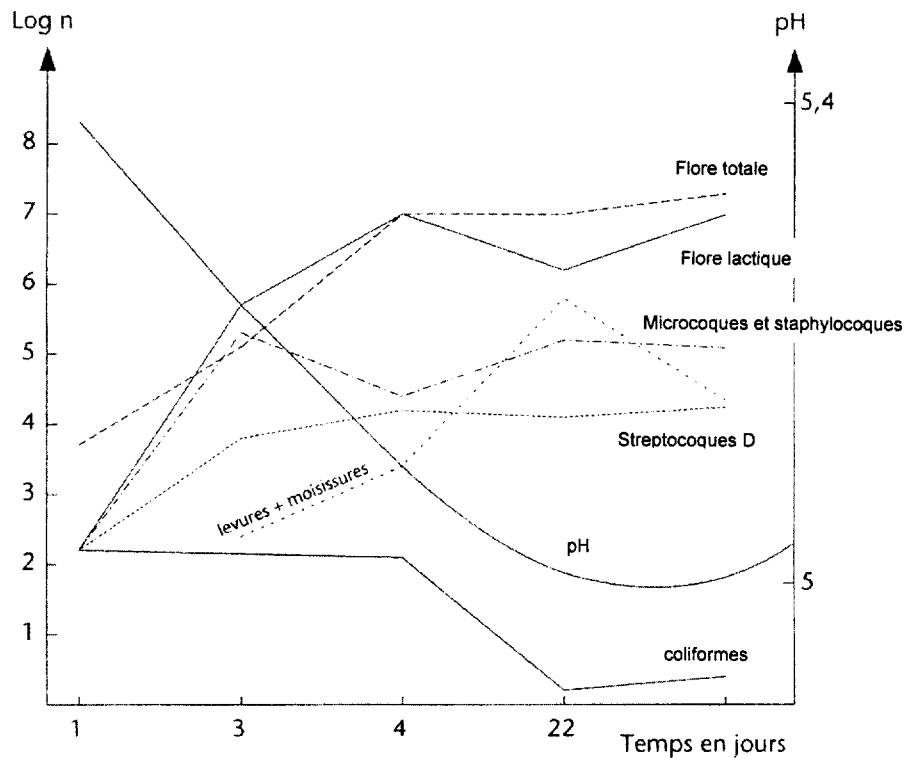
Résultats

| Germes dénombrés | Paroi horizontale du couteau trancheur | Paroi verticale du couteau trancheur |
|---|--|--------------------------------------|
| Flore aérobie mésophile (UFC/ cm ²) | Absent | 1.10 ⁻¹ |
| Coliformes(UFC/ cm ²) | Absent | Absent |

DOCUMENT 5 : CRITÈRES MICROBIOLOGIQUES

| désignation | Microorganismes aérobie 30°C (UFC/g) | Coliformes thermotolérants (UFC/g) | <i>Salmonella</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g) | Anaérobies sulfitoréducteurs à 46°C (UFC/g) |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---|
| Viande fraîche | 5.10 ⁴ | 3.10 ² | Absence dans 25 g | 10 ² | 10 |
| salami | 3. 10 ⁵ | 10 ³ | Absence | 5.10 ² | 50 |

DOCUMENT 6 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION MICROBIENNE DANS LE SALAMI EN FONCTION DU TEMPS



DOCUMENT 7 : PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES EN CHAMP PULSÉ DE L'ADN BACTÉRIEN DES SOUCHES DU FERMENT

Afin de contrôler la qualité de ferment ensemencé, les différentes souches de référence sont mises en culture dans les milieux spécifiques, puis étalées sur milieux gélosés.

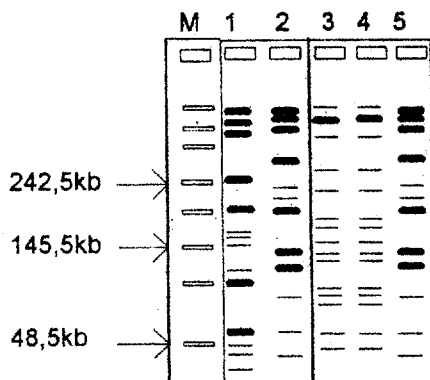
Pour contrôler les souches présentes dans le salami, 25 g de chaque salami ensemencé avec une souche dont on veut contrôler l'implantation sont prélevés et broyés en présence de 100 mL de tryptone sel. Pour chaque essai, des dilutions décimales sont effectuées, puis étalées en surface sur les milieux spécifiques d'isolement :

- Baird Parker
- MRS

puis incubées à la température adéquate pour chaque microorganisme.

Le test d'implantation des souches est effectué par R-ECP entre J3 et J6.

Pour chaque essai, l'ensemble des colonies d'une boîte de Pétri est récupéré dans un tube contenant un tampon, l'ADN bactérien est extrait et des enzymes de restriction *Apal* pour les staphylocoques et *Sfil* pour les lactobacilles sont utilisées. L'électrophorèse en champ pulsé donne les résultats des profils électrophorétiques des populations bactériennes au cours de fermentation et des souches de référence sont les suivants :



M : marqueur de poids moléculaire

1 : profil de la souche 1 de référence : *Lactobacillus plantarum*

2 : profil de la souche 2 de référence : de *Staphylococcus xylosus*

3 : Témoin de la mée (salami non ensemencé)

4 : profil de l'essai après implantation de la souche 1

5 : profil de l'essai après implantation de la souche 2

DOCUMENT 8 : ENSEMENCEMENT ET DÉNOMBREMENT DES MICROORGANISMES À L'AIDE DU SYSTÈME SPIRAL

Préparation de l'échantillon :

25 g de salami sont pesés et sont transférés stérilement dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée puis broyés au stomacher. Le broyat obtenu est filtré pour éliminer les particules alimentaires qui pourrait boucher le stylet tout en laissant passer les micro-organismes.

Ensemencement :

L'appareil muni d'une micropompe dépose, par l'intermédiaire d'un stylet, l'inoculum à la surface d'un milieu solide coulé en boîte de Pétri placé sur un plateau tournant. Le stylet se déplace du centre vers la périphérie décrivant une spirale le long de laquelle il dépose un volume calibré faible et régulier décroissant de l'échantillon.

Lecture :

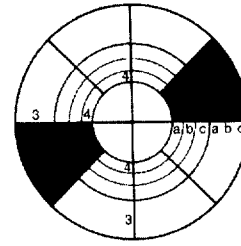
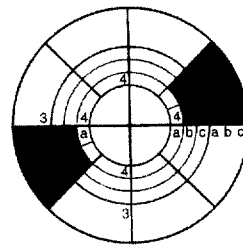
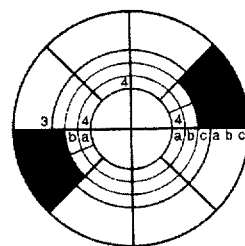
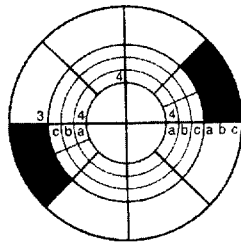
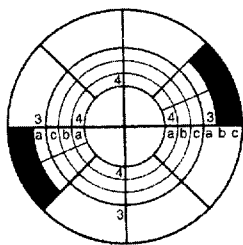
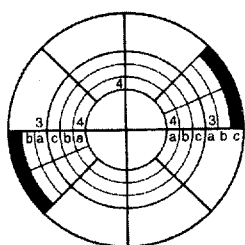
Après incubation, les colonies se développant le long de la spirale sont dénombrées. La grille calibrée permet le dénombrement.

Grille de comptage

Secteur 3c – 0,00054 mL

Secteur 3b – 0,00137 mL

Secteur 3a – 0,00264 mL



Secteur 4c – 0,00457 mL

Secteur 4b – 0,075 mL

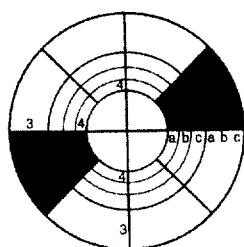
Secteur 4c – 0,0123 mL

volume
2a

Afin de compenser toute irrégularité dans la distribution des colonies, les surfaces équivalentes des secteurs opposés sont comptées. Le calcul du nombre de microorganismes contenus dans l'inoculum est ensuite réalisé.

Résultats obtenus après analyse d'un salami tranché, emballé

L'opérateur dénombre 21 et 25 colonies dans les deux zones opposées de la boîte schématisée ci-dessous.



21 colonies
25 colonies

C.R.D.P.

75, cours Alsace et Lorraine
33075 BORDEAUX CEDEX
Tél. : 05 56 01 56 70

B.T.S. BIOANALYSES ET CONTRÔLES