BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

MATIERE D'ŒUVRE

MICROBIOLOGIE

Premier jour :

1 - Microflore des boues d'épuration

Par élève :

- matériel courant du poste de microbiologie
- colorants nécessaires à la réalisation de la coloration de Gram
- réactif oxydase extemporané
- 1VF en surfusion
- 1 GTS en boîte de pétri
- 1 galerie API NON E (prévoir 48h d'incubation pour la galerie API NON E)
- 1 notice d'ensemencement de la galerie
- souche de Pseudomnas nitrate réductase ⊕ stade N_2 isolée sur boîte de pétri (GTS) noté S(x)

1-2- Traitement des boues avant leur épandage

Par élève :

- 6 BP vides stériles
- pipettes de 1 mL stériles ou équivalent
- 1 flacon de 100 mL de gélose PCA en surfusion à 50 °C
- 1 flacon de 40 mL de gélose PCA en surfusion à 50 °C
- 6 tubes de 9 mL d'eau φ stérile
- 1 tube de BN avec 5.10^6 bactéries par mL noté B(x)
- 1 agitateur mécanique (Vortex)

Dans la salle :

- réserve de matériel
- sachets à autoclave
- bac de Javel
- paniers à autoclave

Deuxième jour :

1 - Microflore des boues d'épuration

Par élève :

- 1 fond noir
- 1 notice de lecture de la galerie + 1 feuillet de report des résultats
- 1 index ou 1 logiciel d'identification (ou plusieurs si possible)

2 – Traitement des boues avant leur épandage

- 1 fond noir
- feutre ou compteur de colonies

Dans la salle :

- 1 index ou 1 logiciel d'identification (ou plusieurs si possible)
- réserve de matériel
- sachets à autoclave
- bac de Javel
- paniers à autoclave

BIOCHIMIE

1.3. Dosage de la teneur en N total par la méthode de Kjeldhal

Produits chimiques

Par élève :

- hydrogénocarbonate de potassium pur et anhydre		0,5 g
- solution d'acide sulfurique à environ 0,04 mol/L		150 mL
- solution d'hydroxyde de sodium à environ 0,1 mol/L		70 mL
- lessive de soude (NaOH à 300 g/L)	distillation traditionnelle :	120 mL
	distillation automatique :	2 L

- indicateurs de pH :
  → méthylorange 1 flacon
  → bleu de bromothymol 1 flacon
- échantillon : noter "minéralisat" 5 mL
  → réaliser une solution de NH_4Cl à 0.9 g/L

Matériel

- 1 micropipette de type P1000 ou pipette de 1 mL
- 1 pipette jaugée de 10 mL
- 1 coupelle de pesée
- 2 (ou 4 ?) erlens de 250 mL
- 1 bécher de 250 mL
- 1 fiole de 100 mL
- 1 fiole de 20 ou 100 mL
- 1 burette de 25 mL
- 1 éprouvette de 100 mL
- lunette de sécurité
- distillateur automatique ou matériel de distillation traditionnelle avec mode d'emploi
- balance de précision.

2.2 Contrôle biochimique : dosage du P dans les eaux épurées par la méthode de Briggs

Produits chimiques

- dihydrogénophosphate de potassium pur et anhydre 0,6 g
- réactif sulfomolybdique 3 mL
  → pour 500 mL : - molybdate d'ammonium 40 g
  - eau distillée 200 mL
  dissoudre (tiédir éventuellement puis laisser refroidir)
  ajouter : - eau distillée 200 mL
  - acide sulfurique pur 120 mL
- solution d'hydroquinone à 10 g/L 3 mL
  → à préparer extemporanément !

- solution de sulfite de sodium à 200 g/L 3 mL
  → à préparer extemporanément !

- échantillon : noter "eau épurée" 20 mL
  → réaliser une solution de KH_2PO_4 à 2.63 mg/L.

Matériel

- 10 tubes à essai
- micropipettes de type P1000 ou pipettes adaptées – P 100
- 1 coupelle de pesée
- 1 bécher de 250 mL
- 1 fiole de 100 mL
- 1 fiole de 20 ou 100 mL
- 8 macrocuves pour spectro
- balance de précision
- spectrophotomètre
- parafilm

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIE ALIMENTAIRES ET LES BIO-ALIMENTAIRES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

CONTRÔLE DES TRAITEMENTS DES EAUX USÉES ET DES BOUES DANS UNE STATION D'ÉPURATION EN ZONE SENSIBLE

Premier jour : 4 H 30

Les eaux usées sont dirigées vers les stations d'épuration afin d'être assainies. Une fois les traitements opérés, elles ne doivent plus contenir qu'une quantité réduite de matières polluantes. Les eaux épurées sont alors rejetées dans les rivières et les fleuves tandis que les boues d'épuration, résidu secondaire, sont généralement épandues sur les terres agricoles.

Les stations d'épuration situées en zone sensible c'est-à-dire dont les eaux se déversent dans des milieux aquatiques menacés par des phénomènes d'eutrophisation, des eaux douces superficielles destinées à la production d'eau potable, des zones d'élevage de coquillage et des lieux de baignade, ont des contraintes particulières. En effet, l'eau doit subir des traitements complémentaires visant à éliminer 70 % de l'azote, 80 % du phosphore et 60 % des contaminants microbiologiques.

Ce sujet propose de déterminer d'une part l'efficacité des traitements complémentaires et d'autre part la composition des boues produites.

1. Étude des boues

1.1. Microflore des boues d'épuration. (16 points)

Les eaux usées sont constituées par les liquides issus des rejets domestiques, agricoles et industriels. La directive européenne du 21 Mai 1991 impose aux communes de plus de 2 000 habitants d'épurer leurs eaux usées avant de les déverser dans les rivières.

La première étape de l'épuration consiste à multiplier artificiellement les bactéries naturellement présentes dans les eaux usées afin d'accélérer le processus d'épuration. Ce procédé conduit à la formation d'un résidu appelé « boues d'épuration ». Ces boues, après un éventuel traitement, sont répandues sur les terrains agricoles afin de recycler leurs éléments minéraux et d'exploiter leurs qualités fertilisantes.

Les bactéries contenues dans les boues permettent notamment l'élimination de l'azote organique en deux étapes successives :

- le processus de nitrification conduisant à la synthèse de nitrates et faisant intervenir *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*.
- le processus de dénitrification permettant la transformation des nitrates en diazote et faisant intervenir différentes espèces bactériennes.

Une bactérie a été isolée de la boue ; elle est présentée sur GTS notée S(x).

1.1.1. Procéder à tous les tests nécessaires à une orientation de la bactérie ; on vérifiera le $2^{ème}$ jour si cette bactérie participe à la dénitrification.

NB : tous les examens et recherches doivent être montrés à un examinateur

1.1.2. À l'aide de la notice fournie, ensemencer la galerie miniaturisée, la gélose VF et la gélose de réisolement (GTS). Indiquer la température d'incubation.

1.2 Analyse microbiologique des boues avant épandage. (14 points)

Le traitement biologique précédent peut s'accompagner d'une « hygiénisation » des boues en vue de diminuer la charge microbienne avant l'épandage. Cette opération consiste à acidifier les boues à pH 3, avec addition de nitrite de sodium, dans le but de diminuer le nombre de germes de 3 logarithmes décimaux.

On se propose de dénombrer les bactéries présentes dans un prélèvement B effectué après le traitement d' «hygiénisation».

1.2.1. Sachant qu'un dénombrement initial a établi la présence de 6.10^{10} bactéries par gramme de boue et que B correspond à une dilution préalable au 1/10 000 de l'échantillon de boue, calculer les dilutions à ensemencer de façon à obtenir un résultat exploitable même si le traitement d'hygiénisation n'a pas été efficace. Justifier.

1.2.2. A partir de B, effectuer un dénombrement dans la masse avec surcouche, en respectant les consignes suivantes :

* milieu : PCA en surfusion à 50°C (le demander à un examinateur)
* essais : 3 dilutions choisies
* Inoculum : 1 mL
* nombre de boîtes par essai : 2

Laisser les boîtes ensemencées sur la paillasse en indiquant la température d'incubation.

1.3 Dosage de la teneur des boues en N total par la méthode de Kjeldhal. (16points)

Afin d'évaluer les propriétés fertilisantes des boues avant leur épandage, un dosage de l'azote total est réalisé.

1.3.1. Mode opératoire

La méthode utilisée emploie deux solutions (acide sulfurique et hydroxyde de sodium) qui sont à étalonner préalablement.

* Etalonnage de la solution d'acide sulfurique à environ 0,04 $mol.L^{-1}$

- peser exactement une masse m d'hydrogénocarbonate de potassium, voisine de 0,1 g
- introduire cette pesée dans un erlen et dissoudre avec environ 30 mL d'eau distillée
- ajouter quelques gouttes de méthylorange (hélianthine)
- doser par la solution d'acide sulfurique. Réaliser deux essais.

* Etalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium à environ 0.08 $mol.L^{-1}$

- introduire dans un erlen 10 mL de solution d'hydroxyde de sodium
- 30 mL d'eau distillée- ajouter quelques gouttes de bleu de bromothymol
- doser par la solution d'acide sulfurique. Réaliser deux essais.

* Minéralisation

Elle a été réalisée préalablement sur une prise d'essai de 10 mL de boues, et en présence de 10 mL d'acide sulfurique et d'un comprimé de catalyseur.
Le minéralisat obtenu est présenté dans le matras de minéralisation.
* Alcalinisation du minéralisat et déplacement de l'ammoniac.

- L'entraînement à la vapeur se fera soit à l'aide d'un distillateur automatique soit avec un appareillage classique. Le distillat est récupéré dans un excès de solution d'acide sulfurique. Pour cela, préparer un erlen contenant :
  - 20 mL de solution d'acide sulfurique à environ 0,04 $mol.L^{-1}$
  - 25 mL d'eau distillée.
- Dosage de l'excès d'acide sulfurique
  L'acide sulfurique en excès est dosé par une solution d'hydroxyde de sodium à environ 0,08 $mol.L^{-1}$, en présence de bleu de bromothymol.

1.3.2.Résultats

Déterminer :

- les concentrations en $mol.L^{-1}$ des solutions d'hydroxyde de sodium et d'acide sulfurique (CV = 1 %) (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{essai} - C_m}{C_m}\right| < 2.CV$ ou $\left|\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}\right| < 2.CV$)
- la teneur en azote en $mg.L^{-1}$ des boues analysées (CV = 5 %)

Données :

- masse molaire de l'hydrogénocarbonate de potassium = 100,1 $g.mol^{-1}$.
- masse volumique de la boue = 1 $kg.L^{-1}$.

2. Analyse des eaux après traitement. (14 points)

Contrôle biochimique : dosage des phosphates dans les eaux épurées par la méthode de Briggs

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement éliminatoire des phosphates en station d'épuration, on se propose de doser les phosphates encore présents dans les eaux épurées. La proportion de phosphates éliminés permettra de calculer le rendement de l'épuration, grandeur caractérisant chaque station.

2.1. *Mode opératoire*

- Préparer une solution mère à 40 mmol.L^{-1} de P par pesée de KH_2PO_4.
- Réaliser une solution étalon fille par dilution au 1/20 de la solution mère.
- Recopier le tableau, le compléter (gamme d'étalonnage et essais) et réaliser la manipulation.

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
quantité de phosphates par tube	µmol	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1		
Sol. étalon fille	mL								
Eau épurée	mL							1	1
Eau distillée qsp 1,4 mL	mL								
réactif sulfomolybdique	mL	0,2							
Hydroquinone	mL	0,2							
Sulfite de sodium	mL	0,2							

- Homogénéiser.
- Laisser reposer 30 minutes à l'obscurité.
- Lire les absorbances à 700 nm.

a. Résultats

- Tracer la courbe d'étalonnage ou bien établir une régression linéaire.
- Déterminer la concentration en phosphates des eaux épurées. CV = 4 % (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{essai} - C_m}{C_m}\right| < 2.CV$ ou $\left|\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}\right| < 2.CV$).
- Calculer le rendement d'épuration en phosphates de la station d'épuration étudiée. Est-il satisfaisant pour une station située en zone sensible ?

Données :

- Masse molaire du KH_2PO_4 = 136,1 g.mol^{-1}.
- Teneur en phosphates des eaux usées arrivant à la station : 0,1 mmol.L^{-1}.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 - TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

CONTRÔLE DES TRAITEMENTS DES EAUX USÉES ET DES BOUES DANS UNE STATION D'ÉPURATION EN ZONE SENSIBLE

Deuxième jour : 1 heure 30

1. Microflore des boues d'épuration

Rappel du 1er jour :

Les bactéries contenues dans les boues permettent notamment l'élimination de l'azote organique en deux étapes successives :

- le processus de nitrification conduisant à la synthèse de nitrates et faisant intervenir *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*.
- le processus de dénitrification permettant la transformation des nitrates en diazote et faisant intervenir différentes espèces bactériennes.

Une bactérie a été isolée de la boue et l'on veut vérifier si elle participe à la dénitrification.

Travail à réaliser :

- lire la galerie biochimique ensemencée.
- Procéder à l'identification du germe à l'aide des tableaux fournis, du code API ou du logiciel.
- D'après les indications du premier jour rappelées ci-dessus, conclure.

2. Traitement des boues avant leur épandage

Dénombrer la flore.

Calculer le nombre d'UFC (unités formant des colonies) par mL d'échantillon dilué.

Données: Formule de la norme AFNOR

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1\ n_2)d}$$

N = nombre d'UFC de microorganismes par mL.

Σ C = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

n_1 = nombre de boîtes retenues à la 1ère dilution (la plus petite).

n_2 = nombre de boîtes retenues à la 2ème dilution (la plus grande).

d = taux de dilution de la première dilution.

V = volume d'inoculum en mL.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Conclure au nombre de microorganismes par g de boue sachant que l'échantillon utilisé est dilué au 1/10 000.

Conclure quant à l'efficacité du traitement, sachant que le nombre initial de microorganismes par g de boue était de 6.10^{10} et que le traitement, pour être considéré comme efficace, doit réduire la quantité initiale de 3 logarithmes décimaux..

BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO – INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** :3

SERUM – TEST

MATIÈRE D'ŒUVRE

IMMUNOTOXICOLOGIE

Par candidat, prévoir:

- un tube à hémolyse avec 0,5 mL de sérum-test Anti A, Anti B (pas Anti A-B) (donner à chaque candidat les références du ST : N°.... fabricant, date de péremption)

pour se procurer les sérums-tests :

- Jacques BOY 45, rue Cognacq- Jay 51065 REIMS Cedex Fax : 03 26 79 72 73
- Diagast laboratoires Eurosanté parc 251, avenue Eugène Avinée BP 9 59 374 LOOS Cedex fax commande : 03 20 96 53 64

Périmés ou non, les tester d'abord ; les sérums monoclonaux ont des titres très élevés, par ex 512, 1024 et plus alors qu'un anti-H, d'origine végétale arrive à peine à du 64. Pour des raisons d'économie, on peut soit diluer les sérums monoclonaux au 1/2 ou plus, soit utiliser des sérums de donneurs.

Prix de revient par candidat : 3F si ST monoclonaux, 9F si ST d'origine végétale

- un tube à hémolyse avec 3 mL d'eau physiologique
- avec 2 mL d'hématies-tests à 3 % correspondant au sérum-test donné au candidat, qui sera *délivré sur commande.*
- une plaque d'opaline ou une plaque jetable en carton : Cartoplaque chez Diagast Eurosanté Parc, 251, avenue E. Avinée BP 9 59 374 LOOS Cedex fax commandes 03 20 96 53 64 100 pièces réf 90 209
- une pipette automatique p100 ou 200
- des cônes adéquats
- un agitateur en verre
- 3 pipettes jetables
- 1 chronomètre
- une poubelle de table
- un portoir avec 12 tubes à hémolyse vides
- gants à la disposition des candidats (sans qu'ils soient imposés).

Par laboratoire:

- 2 jeux d'hématies-tests A1, B et O à 10% à apporter aux candidats à la demande (laver 2 fois ces hématies-tests à l'eau physiologique puis les mettre en suspension à 10% en eau physiologique). Prévoir _ x 1 mL de chacune des hématies-tests + pipettes jetables. Commander à l'EFS le plus proche ou aux adresses ci- dessus.
- Centrifugeuses (1 ou 2 par salle).

BIOCHIMIE

Matériel par poste :

- P 1000 réglable + cônes bleus ou équivalent ;
- P 100 réglable + cônes jaunes ou équivalent ;
- 10 cuves sur leur portoir ;
- 1 fiole jaugée de 100 mL ;
- carrés de papier filtre prédécoupés, et de parafilm ;
- papier doux non pelucheux ;
- 1 placard disponible pour porter les tubes à l'obscurité ;
- 1 agitateur mécanique (vortex) pour deux étudiants ;
- 1 feuille de papier millimétré.

Matériel pour la salle :

- 1 spectrophotomètre pour lecture à 700 nm à cuves ou à aspiration, pour 8 étudiants maxi.

Réactifs par poste :

- Solution étalon de sérum albumine bovine à 200 $mg.L^{-1}$: 1 mL ;
- Solution de contrôle de sérum albumine bovine à 100 $mg.L^{-1}$: 1 mL ;
- Sérum test : le même que pour l'immunologie : 1,5 mL ;
- Solution alcaline de complexonate de cuivre : 15 mL ;
  - Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH à 0,1 $mol.L^{-1}$
  - Solution B : tartrate double de Na et K à 20 $g.L^{-1}$
  - Solution C : $CuSO_4$, 5 H_2O à 10 $g.L^{-1}$

Préparer extemporanément la solution réactive en respectant l'ordre d'addition des réactifs et en agitant après chaque addition : Solution C : 10 mL ; Solution B : 10 mL ; Solution A : 1 Litre.

- Réactif de Folin dilué au demi : 1,5 mL.

Tableau de la gamme d'étalonnage complété

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Contrôle	Essai 1	Essai 2
Sol. étalon mère à 200 µg/mL	µL	0	50	100	150	200	250			
Sérum test dilué au 1/200	µL								250	250
Sol. Contrôle à 100 µg/mL	µL							250		
Eau physiologique qsp 500 µL	µL	500	450	400	350	300	250	250	250	250
Solution alcaline de Cu^{2+}	mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Homogénéiser ; attendre 5 minutes.										
Folin au ½	µL	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Homogénéiser ; attendre 30 minutes à l'obscurité ; lire à 700 nm.										
Quantité de protéines par tube	µg	0	10	20	30	40	50			
A obtenue										

MICROBIOLOGIE

Dénombrement de la flore aérobie mésophile à 30°C.

- Eau physiologique renfermant 10^2 mL^{-1} d'*Enterococcus faecalis*. et répartis en tube à vis à raison de 10 mL tubes (notés L + numéro de paillasse).
- 2 tubes d'eau peptonée tamponnée de 9 mL (prévoir une réserve).
- 6 boites de Pétri stériles vides.
- 3 pipettes graduées de 1 mL (ou micropipettes et cônes ou pailles stériles pour délivrer 1 mL).
- 1 système d'agitation mécanique (vortex) pour 1 candidat.
- 6 tubes de gélose PCA de 15 mL en surfusion.
- 6 tubes de gélose blanche de 5 mL en surfusion.

Identification de la souche bactérienne

Jour 1

- 1 gélose inclinée (trypticase soja) ensemencée en nappe avec une culture pure de *Pseudomonas* non pigmenté cultivant à 37°C (pour une culture en 24 heures).
- Languettes ou autre matériel pour réaliser le test de l'oxydase.
- 1 galerie API 20 NE + fond + couvercle + 1 ampoule Aux medium.
- 1 GTS
- Un protocole opératoire de la galerie.
- 1VF en surfusion.
- 1 tube de 2 mL d'eau physiologique en vue de la réalisation de la suspension à 0,5 McF.
- étalon 0,5 McF (1 pour 4 candidats).

Jour 2

- 1 fiche de lecture Api 20 NE, code API, logiciel d'identification
- Les réactifs habituels pour révélation : Nit1, Nit2, James (Kovacs).

Une souche microbienne

- Des cultures de 5 jours minimum de *Mucor* et *Penicillium* présentées en gélose Sabouraud + chloramphénicol (alterner les numéros).
- Anse «spatule», pinces.
- 1 mL de bleu lactophénol distribué en tube à hémolyse stérile par étudiant.
- Lame et lamelle (2 de chaque) + éventuellement du scotch.
- Documents pour l'identification.

Consignes Microbiologie

Distribuer la galerie Api 20 NE, VF, GTS après avoir ramassé l'annexe 2.

Définir une heure de remise de cette annexe à savoir 2 h après le début de l'épreuve.

Prévoir une échelle de résultat pour l'intensité des agglutinations.

BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO - INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION

U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

SERUM – TEST

Premier jour : 4 H 30

IMMUNO - TOXICOLOGIE (15 points)

1.1 Textes officiels :

D'après la circulaire de la D.G.S. 264.84, les caractéristiques et normes des réactifs utilisés en immuno-hématologie érythrocytaire sont les suivantes :

1.1.1. Dispositions générales applicables à tout réactif pour groupages sanguins :

Spécificité :

"Le réactif doit reconnaître exclusivement les échantillons d'hématies porteuses de l'antigène correspondant et ne doit réagir avec aucun antigène reconnu distinct de ce dernier."

Puissance :

"Elle est appréciée par 3 critères : le titre, le score d'agglutination et l'intensité. En outre pour les réactifs utilisés sur plaque, l'avidité doit être appréciée."

1.1.2. Dispositions particulières à chaque catégorie de réactifs :

Puissance : critères minimaux exigibles pour réactifs de groupage ABO :

Réactifs	Hématies- tests	Avidité	Intensité	Titre	Score
Anti-A	A 1	8 s	+	64	50
Anti-B	B	8 s	+++	64	50
Anti-AB	A 1 et B	Caractéristiques de l'anti -A et de l'anti -B			

1.2. Techniques :

1.2.1. Recherche de la spécificité du sérum-test :

Sur une plaque en carton, déposer côte à côte :

1 goutte d'hématies -tests A1 à 10% en eau physiologique.

1 goutte d'hématies -tests B à 10 % en eau physiologique,

1 goutte d'hématies -tests O à 10% en eau physiologique.

Ajouter 1 goutte de sérum-test à tester.

Mélanger à l'aide d'un agitateur essuyé à l'aide d'un papier filtre jeté ensuite dans la poubelle des déchets contaminés.

Lire : donner l'intensité en croix : 4 +, 3 +, 2 +, 1 + ou nulle. Conclure

En déduire la nature des hématies tests à utiliser pour les tests suivants (avidité, intensité, titre et score) et les demander à l'examinateur.

1.2.2. Mesure de l'avidité :

Sur la même plaque en carton, déposer 1 goutte d'hématies - tests choisies et 1 goutte de sérum- test à tester.

Mélanger rapidement à l'aide d'un agitateur pour former une surface de réaction circulaire de 3 cm de diamètre.

Déclencher alors le chronomètre.

Mesurer le temps d'apparition en secondes des agglutinats visibles à l'œil nu.

1.2.3. Mesure de l'intensité :

Elle est appréciée 3 minutes après la fin de l'étalement précédent en agitant la plaque pour homogénéiser le mélange. (Comparer à l'échelle de résultats fournie par le centre).

1.2.4. Mesure du titre et du score :

La gamme de dilutions du sérum-test se fait en eau physiologique sous un volume de 100 µL dans 12 tubes à hémolyse à partir de la dilution au 1/2 du sérum. La raison est de 1/2. Rejeter 100 µL du dernier tube.

Ajouter 100 µL d'hématies - tests adéquates à 3% en eau physiologique, homogénéiser puis centrifuger pendant 1 minute à 2000 tours/min.

Après une légère agitation pour décoller le culot, lire à l'œil nu sur fond blanc.

Pour le calcul de la dilution finale, tenir compte du volume des hématies-tests.

- Déterminer le titre, dilution limite donnant une agglutination visible.
- Déterminer le score : pour cela évaluer la réaction d'agglutination dans chaque tube selon les conventions ci-dessous, puis additionner ces points pour obtenir le score final.

4+ ou 3 +	=	score 10
2+	=	score 8
+	=	score 5
(+)	=	score 2
0	=	score 0

(+) : réaction faiblement positive.

1. 3. Compte rendu

Sérum – test : n° : date de péremption : références :

1. Spécificité du sérum- test , résultats :
2. Avidité :
3. Mesure du titre et du score :
   - Mode opératoire ; tableau de travail et résultats.
   - Titre :
   - Score :
4. Tableau récapitulatif des résultats et des critères ; Conclusion.

BIOCHIMIE (15 points)

On se propose de vérifier la concentration en protéines totales du sérum test. En effet, de l'albumine est rajoutée dans le milieu, de manière à éviter le « collage » lors des réactions antigène – anticorps. Ces sérums contiennent donc normalement entre 10 et 20 $g.L^{-1}$ de protéines totales.

Cette vérification se fera par dosage colorimétrique selon la méthode de Folin – Lowry.

2.1 Gamme d'étalonnage :

À partir de la solution étalon de sérum albumine bovine à 200 $mg.L^{-1}$, préparer une gamme d'étalonnage en 6 cuves de 0 à 50 µg de protéine par cuve.

Compléter toutes les cuves à 0,5 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter 1 mL de solution alcaline de sulfate de cuivre. Agiter. Attendre 5 minutes.

Ajouter 0,1 mL de réactif de Folin prêt à l'emploi. Agiter.

Laisser les cuves 30 minutes à l'obscurité.

Lire les absorbances contre le blanc réactif à 700 nm.

2.2 Essais sur le sérum test :

Effectuer une prédilution du sérum-test en eau physiologique, de manière à pouvoir réaliser les essais dans des conditions satisfaisantes.

Réaliser deux cuves essais sur cette dilution du sérum-test.

2.3 Contrôle :

Réaliser la manipulation sur une solution de contrôle dont la concentration est de 100 $mg.L^{-1}$.

2.4 Résultats :

- Remplir le tableau récapitulant la composition de chaque cuve (annexe 1 à rendre) en explicitant les calculs.
- Tracer la courbe d'étalonnage A = fonction (quantité de protéines dans la cuve, exprimé en µg) ou réaliser la régression linéaire. Justifier le choix des points retenus.
- En déduire les quantités de protéines dans les cuves contrôles et essais en le justifiant.
- Calculer la concentration de la solution contrôle.
- La manipulation peut-elle être validée sachant que le CV admissible pour cette méthode est de 3 % :
  - pour le contrôle d'une part, (on considèrera le contrôle valide si l'écart relatif à la valeur attendue est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{contrôle} - C_{valeur\ attendue}}{C_{valeur\ attendue}}\right| < 2.CV$)
  - pour les deux essais d'autre part (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{essai} - C_m}{C_m}\right| < 2.CV$ ou $\left|\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}\right| < 2.CV$)
- Calculer la teneur en protéines du sérum-test, en $g.L^{-1}$.
- Conclure.

MICROBIOLOGIE (30 points)

De nombreux problèmes de contaminations ont été signalés dans le laboratoire de conditionnement des sérums . On se propose de réaliser la vérification du plan de nettoyage appliqué en procédant à l'étude de la contamination de certains points de contrôle.

3.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile (9 points)

La numération de la flore aérobie mésophile est effectuée selon la technique de comptage des colonies en double couche en gélose pour dénombrement (PCA), une gélose blanche étant utilisée pour la double couche.

Préparation de la solution mère :

La solution mère à dénombrer correspond à une solution de 10 mL obtenue par écouvillonnage d'une surface de 25 cm^2.

On obtient la solution mère de 10 mL présentée en tube à vis noté (L + numéro) conservée à + 4°C.

Conduite du dénombrement :

Réaliser les dilutions 10^{-1} et 10^{-2}. La technique de dilution est à montrer à l'examinateur.

Ensemencer, en double, le produit pur et les dilutions dans la masse du milieu.

Incuber les boîtes à 30°C pendant 24 h.

3.2. Identification d'une souche bactérienne. (15 points)

Une souche bactérienne a été isolée à partir de la solution albumineuse servant de diluant.

Cette souche est présentée en culture sur gélose inclinée (trypticase soja) incubée 24 heures à 30°C.

3.2.1. Procéder à l'observation microscopique de cette souche en réalisant une coloration de Gram.

3.2.2. Réaliser le ou les tests enzymatiques adéquats.

3.2.3. Proposer par écrit une orientation du germe à identifier (annexe 2 à rendre).

3.2.4. Ensemencer la galerie biochimique miniaturisée fournie, la gélose pour réisolement (GTS) et la gélose VF. Un étalon de Mac Farland est disponible. Indiquer sur tous les milieux la température d'incubation choisie.

DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE

FEUILLE DE RÉSULTATS DE BIOCHIMIE

Gamme : explications sur sa préparation :

Sérum-test : Calcul de la prédilution et de la prise d'essai :

Contrôle : Calcul de la prise d'essai :

Tableau récapitulatif :

Tube	unités	0	1	2	3	4	5	Contrôle	Essai 1	Essai 2
Sol. étalon mère à	µL									
Sérum-test	µL									
Sol. Contrôle à	µL									
Eau physiologique	µL									
Solution alcaline de Cu^{2+}	µL									
Homogénéiser ; attendre 5 minutes.										
Folin au 1/2	µL									
Homogénéiser ; attendre 30 minutes à l'obscurité ; lire à 700 nm.										
Quantité de protéines par cuve	µg									
Absorbance obtenue										

Courbe d'étalonnage ou régression linéaire

ANNEXE 1 (suite)

DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE

Concentration du contrôle, en $g.L^{-1}$:	
La manipulation est-elle validable ?	

Essais :

	Essai 1	Essai 2
Concentration du sérum, en $g.L^{-1}$:		

Discussion sur ces résultats :

Concentration retenue du sérum, en $g.L^{-1}$:	

Conclusion :

DOCUMENT À RENDRE ET À AGRAFER AVEC LA COPIE

Microbiologie

Numéro du poste : ☐
Numéro de la souche : ☐
Observation microscopique :

Résultat du ou des tests enzymatiques :

Orientation proposée :

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION

U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

SERUM – TEST

Deuxième jour : 1 H 30

CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES

1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile à 30°C

Rappel : La solution mère à dénombrer, utilisée le premier jour, correspond à une solution de 10 mL obtenue par écouvillonnage d'une surface de 25 cm^2.

Dénombrer la flore aérobie mésophile.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer le nombre d'UFC (unités formant des colonies) par mL de solution mère.

Données: Formule de la norme AFNOR

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 \quad n_2)d}$$

N = nombre d'UFC de microorganismes par mL.

Σ C = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

n_1 = nombre de boîtes retenues à la $1^{ère}$ dilution (la plus petite).

n_2 = nombre de boîtes retenues à la $2^{ème}$ dilution (la plus grande).

d = taux de dilution de la première dilution.

V = volume d'inoculum en mL.

En déduire la quantité de microorganismes par cm^2.

Discuter le résultat.

Données : les recommandations précisent, dans une enceinte de ce type classée en niveau 4, le seuil suivant : colonies par cm^2 : inférieur à 0,2.

2. Identification de la souche bactérienne.

Lire la galerie biochimique ensemencée et incubée 24 heures à 30°C.

Procéder à l'identification du germe à l'aide des tableaux, du code API ou du logiciel.

3. Identification d'une souche microbienne de l'environnement (6 points)

Une souche microbienne a été isolée à partir du système de climatisation du laboratoire.

Cette souche est présentée sur gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol en tube et a été incubée 4 jours à 25 °C.

3.1. Réaliser l'observation macroscopique.

3.2. Réaliser l'observation microscopique adéquate.

3.3. Proposer une identification à l'aide de la documentation fournie par le centre.

BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTARIES ET LES BIO-INDUSTRIES
Session 2002
E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

MATIÈRE D'ŒUVRE

BIOCHIMIE

Matériel:

	Par personne	Par salle
Dosage de l'activité ASAT		
Semi microcuves UV + portoir	2	
Parafilm		
Pipette automatique P100 + 2 cônes jaunes	1	
Bain thermostaté à 30 °C avec portoir pour cuve		1
Spectrophotomètre thermostaté réglé sur 340 nm mode cinétique		1

Dosage des phosphates		
Macrocuves visible + portoir	8	
Parafilm		
Tube conique à centrifuger contenant 10 mL	1	
Fiole jaugée de 100 mL	1	
Pipette jaugée de 10 mL	1	
Becher contenant 100 mL	1	
Pissette eau distillée	1	
Compte goutte	1	
Centrifugeuse + plots + balance pour équilibrage		1
Spectrophotomètre réglé sur 700 nm		1
Feuille de papier millimétré	1	
Pipette automatique P1000 +3 cônes bleus	1	

Réactifs:	Par personne	Par salle
Sérum de veau fœtal : Eurobio 010062 en flacon 100 mL noté « SÉRUM »	5 mL	

Dosage de l'activité ASAT		
Coffret de dosage ASAT Biomérieux Enzyline ASAT/GOT (standardisé 50 (1 coffret pour 50 tests)		
Mélange réactionnel (R1 +R2)		1
Réactif déclenchant (R3)		1

Dosage phosphates du lait		
Solution KH_2PO_4 à 0,85 g/L	25 mL	
Solution Acide trichloroacétique (ATCA) à 200 g/L (DANGER)	10 mL	
Réactif sulfomolybdique (Briggs)	6 mL	
Solution Hydroquinone à 10 g/L	3 mL	
Solution sulfite de sodium à 200 g/L	3 mL	
Flacon de récupération Briggs		1

TOXICOLOGIE

Matériel:	Par personne	Par salle
Microplaque à fond plat	1	
Pipette automatique P100 + 5 cônes jaunes	1	
Pot + glace	1	
Lecteur de microplaque réglé sur 405 nm		1
Chronomètre	1	
Feuille de papier millimétré	1	

Réactifs:	Par personne	Par salle
Sérum de veau fœtal (Eurobio) dilué au 1/2 en eau physiologique en tube à hémolyse noté "SVF" dans la glace. Ajuster la dilution pour avoir une absorbance comprise entre les cupules 8 et 9.	100 µL	
Tampon DEA pH 10 noté "diluant" en tube à hémolyse	600 µL	
Solution de PNPP à 0,185 g/L en tampon DEA en tube à hémolyse entouré de papier alu noté "LAL" dans la glace. Ajuster la concentration pour avoir une absorbance d'environ 1,5 pour la cupule 1.	700 µL	
Solution de soude à 5 mol/L en tube à hémolyse noté "stop"	1,5 mL	
Solution de PAL Roche calf intestine (108162 1 flacon 100 mg -> 10 mL) au 1/100 en eau phy ou en tampon DEA (plus stable) en tube à hémolyse noté "LPS" dans la glace	150 µL	

MICROBIOLOGIE

Contrôle de fertilité

Souches et mélanges		
Staphylococcus aureus en bouillon identifié « SA+ n° poste »	1	

Milieux et matériels		
Flacons de 15 mL de GTS en surfusion	2	
Pipettes graduées stériles de 2 mL ou P1000 + cônes bleus	2	

Vérification de souche contrôle

Souches et mélanges		
Bacillus subtilis contaminé par Pseudomonas aeruginosa apigmenté, en Bouillon identifié «BS+n°poste»	1	

Milieux et matériels		
GTS en boite	1	

Recherche de bactériophage

Souches et mélanges		
1 mL d'E coli sensible au phage T2 en bouillon Mueller Hinton identifié « EC+ n° poste »	1	
2 mL d'une suspension en eau peptonée de phage T2 à 103 – 104 phage / mL en tube à hémolyse identifié« S PHAGE + n° poste » »	1	

Milieux et matériels		
Tubes de 9 mL exactement d'eau peptonée	3	
Géloses Mueller Hinton en boite de Pétri	6	
Tubes contenant 5 mL de gélose Mueller Hinton molle (5g/L d'agar) en surfusion	6	
P 100 + cônes stériles	3	

JOUR 2	Par personne	Par salle
Réactifs oxydase et catalase		

Prévoir de pouvoir donner des isolements réussis de Bacillus + Pseudommas

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2002

E5 – TECHNIQUE D'ANALYSE ET DE PRODUCTION

U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLES

CONTRÔLE DE QUALITÉ D'UN SÉRUM DE VEAU FŒTAL

Durée : 6 heures **Coefficient :** 3

Premier jour : 4 H 30

Le sérum de veau fœtal est couramment utilisé comme complément aux milieux de cultures cellulaires. Il est très riche en diverses substances nutritives (glucose, acides gras libres...), en éléments minéraux (fer, calcium, potassium, phosphates, sodium...), en enzymes, hormones...

Il est donc nécessaire de procéder à de nombreux contrôles afin de déterminer la composition exacte du sérum en ces différentes substances.

D'autre part, l'utilisation de sérum de veau fœtal présente certains risques liés à la présence de virus, d'agents pathogènes non conventionnels, de bactéries, de LPS (endotoxines). La fiche suivante récapitule les différents critères utilisés :

Fiche de contrôle qualité d'un sérum de veau fœtal

Analyse biochimique	
Phosphates	27,9 à 29,1 mmol/L
ASAT	47 à 51 UI/L (780 à 850 nkat/L)
Analyse toxicologique	
LPS (Endotoxines)	< 10 UI/mL
Analyse microbiologique	
Stérilité	Stérile
Phages	Absence
Fertilité sur souches de référence	Culture

L'absence de ces éléments doit donc être vérifiée.

Analyse biochimique de la composition d'un sérum de veau fœtal (26 pts)

1. Dosage de l'activité enzymatique Aspartate amino transférase (ASAT)

1.1. Principe

L-aspartate + 2 oxoglutarate $\xrightarrow{\text{ASAT}}$ oxaloacétate + L-glutamate

oxaloacétate + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-malate + NAD^+

ASAT = aspartate oxaloacétate transférase
MDH = malate deshydrogénase

1.2. Mode opératoire

À partir du sérum de veau fœtal fourni noté « SÉRUM », réaliser le test suivant.
Longueur d'onde 340 nm.
Cuve de 1 cm de trajet optique.
Faire le zéro sur l'air ou sur de l'eau distillée.
Dans une cuve thermostatée à 30°C, introduire :

Introduire	Essai 1	Essai 2
Mélange réactionnel	1 mL	1 mL
Échantillon (Noté « SÉRUM »)	100 µL	100 µL
Mélanger, incuber 10 minutes à 30°C puis ajouter		
Réactif déclenchant	100 µL	100 µL
Mélanger, attendre 1 minute		
Mesurer la variation d'absorbance (ΔA/min) pendant 1 à 3 minutes		

1.3. Résultats

Déterminer la vitesse initiale de la réaction en µmol/L/min ou en µmol/L/s.
En déduire l'activité de l'échantillon en UI ou en katal et la concentration catalytique de l'ASAT en UI/L ou en katal/L.
Conclure sur la conformité du sérum.

Données : $\varepsilon_{NADH\ 340\ nm} = 630\ m^2.mol^{-1}$

CV = 4% (on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{essai} - C_m}{C_m}\right| < 2.CV$ ou $\left|\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}\right| < 2.CV$)

2. Dosage des phosphates

2.1. Principe

Après défécation du sérum, c'est-à-dire élimination des protéines, les phosphates sont dosés par la méthode de Briggs.

Les phosphates, sous forme HPO_4^{2-} et $H_2PO_4^-$, réagissent en milieu acide avec le molybdate d'ammonium pour donner le complexe phosphomolybdique. Ce dernier est réduit pour donner le complexe phosphomolybdeux-molybdique qui absorbe à 700 nm.

2.2. Défécation

Dans un tube à centrifuger conique, introduire :

Sérum de veau fœtal noté « SÉRUM »	0,5 mL
ATCA à 200 g/L	3,5 mL

(ATCA = acide trichloroacétique)

Boucher le tube, agiter puis laisser reposer 10 minutes.

Centrifuger 10 minutes à 5000 tr/min.

Pratiquer rapidement la réaction de dosage.

2.3. Préparation d'une solution étalon et d'une gamme d'étalonnage

À partir d'une solution mère de KH_2PO_4 à 6,5 mmol.L^{-1}, préparer 100 mL d'une dilution au 1/10. Réaliser une gamme étalon de 6 cuves selon le tableau ci-dessous.

Cuve	0	1	2	3	4	5
Quantité de P en µmol						
Volume de solution fille en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée en mL	1,5	1,3	1,1	0,9	0,7	0,5
Réactif sulfomolybdique en mL	0,5					
Hydroquinone en mL	0,25					
Sulfite de sodium en mL	0,25					

Laisser reposer 20 minutes à l'obscurité.

Lire l'absorbance à 700 nm.

2.4. Dosage

Réaliser 2 essais contenant 0,5 mL du surnageant de sérum noté « SÉRUM ».

Déterminer la quantité de phosphate en µmol par tube.

Déterminer la concentration molaire en phosphates du sérum.

Conclure sur la conformité du sérum.

Donnée : CV = 2%

(on considèrera les essais valides si l'écart relatif à la moyenne est inférieur à ±2 CV, soit $\left|\frac{C_{essai} - C_m}{C_m}\right| < 2.CV$ ou $\left|\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2}\right| < 2.CV$)

Étude toxicologique d'un sérum de veau fœtal (12 pts)

1. Principe

La recherche des endotoxines (LPS) se fait par l'utilisation d'un réactif particulier, le LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*). En présence d'endotoxines (LPS), les composants du LAL sont activés au cours d'une réaction protéolytique en cascade qui aboutit à la dissociation d'un substrat peptidique artificiel incolore. Cette dissociation libère de la p-nitroaniline (pNA) qui est de couleur jaune et absorbe à 405 nm.

2. Réalisation pratique

Matériel et réactifs :

1 tube de solution étalon d'endotoxine (LPS) de concentration connue = 0,2 UI/µL = « LPS »

1 tube de solution de substrat = « LAL »

1 tube de diluant

1 tube de sérum à tester = « SVF »

Microplaque à fond plat.

Protocole :

On réalise une dilution en série d'un étalon d'endotoxine de la cupule 1 à 10 et l'on ajoute le LAL à chaque dilution.

La cupule 11 sera l'essai.

La cupule 12 sera un témoin.

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Essai	T
Solution d'endotoxine étalon (µL)	50	50										
Diluant (µL)		50	50	50	50	50	50	50	50	50		
Redistribuer (µL)			50	50	50	50	50	50	50	50 (*)		
Quantité LPS (UI par cupule)												
Substrat (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
Sérum à tester noté « SVF » (µL)											50	
Incuber 3 minutes exactement												
Soude = solution stop (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

(* rejeter 50 µL)

Lire l'absorbance contre le témoin à 405 nm.

Compte rendu

Donner la composition et le rôle du témoin.

Donner la quantité de LPS par cupule en UI.

Tracer la droite A = f(quantité LPS/cupule).

Donner la concentration en UI/mL du sérum de veau fœtal en LPS.

Conclure sur la conformité du sérum.

Donnée : Limite de linéarité du lecteur de microplaque fournie par le centre.

Aspects microbiologiques (22 pts)

Sur le plan microbiologique, les lots de sérum doivent être contrôlés par rapport aux paramètres suivants :

- la stérilité (absence de bactérie et de champignon microscopique),
- l'absence de mycoplasmes,
- l'absence de bactériophages,
- l'absence de plusieurs virus (virus de la diarrhée bovine (BDV), virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (RTIV) et virus Para influenza 3 (PIV3).

Les examens réalisés porteront sur l'étude de la stérilité ainsi que la recherche des bactériophages.

1. Contrôle de fertilité

La présence du produit à contrôler peut masquer la présence de micro-organisme du fait de propriétés bactériostatiques. La fertilité du milieu de culture pour les micro-organismes de contrôle doit donc être vérifiée sur des milieux additionnés de sérum.

1.1. Préparation des milieux

Dans le cas de la méthode de contrôle par ensemencement direct, le **rapport de dilution recommandé est de 1/10** entre le produit liquide à contrôler et le milieu de culture. On respectera ces proportions en utilisant un milieu gélosé.

En suivant ces recommandations, ajouter dans la masse un volume adéquat de sérum issu du flacon noté « SÉRUM » avec du milieu gélosé à l'hydrolysat de caséine et de soja (GTS) proposé en surfusion (volume 15 mL/flacon).

Couler ainsi deux milieux GTS additionnés de sérum en boîtes de Pétri. Laisser solidifier les géloses.

1.2. Ensemencement des milieux

Le micro-organisme de contrôle utilisé dans cet essai est *Staphylococcus aureus* souche ATCC 6538 P. Il est présenté en bouillon identifié par le sigle « SA ». Réaliser un ensemencement sur chacune des deux géloses préparées précédemment avec cette souche par la technique d'isolement.

Incuber ces boîtes 24 h à 37°C.

1.3. Vérification d'une autre souche de contrôle

On dispose d'une souche présentée en bouillon contenant un autre micro-organisme de contrôle qui est *Bacillus subtilis* souche ATCC 6633. Le bouillon est identifié par le sigle « BS ». On souhaite contrôler la pureté de cette souche pour vérifier qu'elle est utilisable pour le contrôle de fertilité des milieux de culture.

Réaliser Gram et état frais sur cette souche ainsi qu'un réisolement sur GTS en boîte. Incuber la boîte 24 h à 37°C.

2. Recherche des bactériophages

2.1. Principe

Cette recherche est réalisée par la technique des plages de lyse obtenue sur gélose présentant une culture homogène de *Escherichia coli* phage-sensible. La bactérie est présentée en bouillon identifié par le sigle « EC ».

2.2. Réalisation du test

Réaliser des dilutions 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} de la solution de sérum marquée « S PHAGE » dans des tubes de 9 mL d'eau peptonée. Chaque dilution sera testée en double.

Traiter chaque tube séparément de la manière suivante :

- introduire dans des tubes de gélose Mueller Hinton molle en surfusion à 45°C : 0,1 mL de «EC» et 0,1 mL des différentes dilutions de «S PHAGE».
- homogénéiser à l'agitateur mécanique (vortex) ;
- verser stérilement la totalité du tube au centre d'une boîte de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton solidifiée ;
- répartir à la surface de la gélose ;
- laisser solidifier les boîtes et les placer à l'étuve 24 h à 37°C.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO - INDUSTRIES
Session 2002
E5 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION
U 52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures **Coefficient** : 3

CONTRÔLE DE QUALITÉ D'UN SÉRUM DE VEAU FŒTAL

Deuxième jour : 1 heure 30 min

Aspects microbiologiques :

Rappel : Aspect qualité microbiologique

- stérilité	stérile
- phages	absence
- fertilité sur souches de référence	culture

1. Contrôle de fertilité

Lecture des milieux ensemencés

Rechercher la présence de colonies sur les boîtes de GTS additionné de sérum.

Vérifier la nature des colonies observées par la coloration de gram et la recherche d'une enzyme. Conclure.

Vérification de l'autre souche de contrôle

Décrire les colonies présentes sur le milieu GTS.

Vérifier la nature des différentes colonies observées par des tests d'orientation rapides (gram et recherche d'enzymes). Conclure et proposer une orientation pour le contaminant.

2. Recherche des bactériophages

Lecture des plages de lyse

Le cas échéant, dénombrer les plages de lyse sur les milieux. Consigner les résultats dans un tableau.

À partir des résultats obtenus, exprimer le titre du sérum « S PHAGE » en nombre d'Unités Formant Plages (UFP) par mL de solution.

3. Conclure sur la conformité du sérum.