

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

## ÉPREUVE E3 – UNITÉ U32 MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2023

\_\_\_\_\_

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

\_\_\_\_\_

### **Matériel autorisé :**

- L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
- L'usage de la calculatrice sans mémoire « type collègue » est autorisé.
- Dictionnaire anglais-français autorisé.

Tout autre matériel est interdit.

### **Capacités évaluées :**

<b>Mobilisation des connaissances de microbiologie et technologies d'analyse dans le cadre de situations professionnelles</b>	<b>4 points</b>
<b>Qualités d'analyse</b>	<b>6 points</b>
<b>Aptitude à la réflexion et au raisonnement scientifique</b>	<b>6 points</b>
<b>Qualités de synthèse</b>	<b>3 points</b>
<b>Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition</b>	<b>1 point</b>

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.  
Le sujet se compose de 13 pages, numérotées de 1/13 à 13/13.

## Recherche de *Listeria monocytogenes* en industrie alimentaire et essais de bioprotection

Le site gouvernemental des alertes des produits dangereux « Rappel conso » a publié le vendredi 25 juin 2021 un rappel concernant un beurre cru fermier de la marque « F » pour « présence de *Listeria monocytogenes* » (Source : <https://rappel.conso.gouv.fr/>).

L'entreprise a alors mis en place une série d'autocontrôles au niveau des points critiques du procédé de fabrication du beurre afin de retrouver l'origine potentielle de la contamination.

L'entreprise envisage également de modifier son protocole de décontamination des surfaces et d'évaluer la capacité de multiplication de *Listeria monocytogenes* dans le beurre, dans les conditions de conservation préconisées.

### 1. Contrôles microbiologiques dans l'entreprise

Le règlement 2073/2005 de la commission européenne du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires définit différents types de critères, et détaille en annexe ces critères pour les différents aliments et les différents micro-organismes. Deux extraits de ce règlement sont présentés dans le **document 1**.

**Q1.** Expliquer le fait que *Listeria monocytogenes* soit classée dans les critères de sécurité plutôt que dans les critères d'hygiène du procédé.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour rechercher *Listeria monocytogenes* dans un produit agroalimentaire : la méthode de référence et les méthodes alternatives.

**Q2.** Expliquer l'intérêt de l'utilisation de méthodes alternatives.

Le **document 2** présente le protocole de recherche de *Listeria monocytogenes* dans les aliments selon la méthode de référence.

**Q3.** Expliquer l'intérêt de la première étape de la méthode de référence.

Le **document 3** présente la composition de la gélose ALOA (O&A) utilisée dans la méthode de référence.

**Q4.** Déduire de sa composition les caractéristiques de la gélose ALOA en argumentant la réponse.

**Q5.** Expliquer l'intérêt de la présence d'extrait de levure en complément des digestats dans ce milieu.

Le **document 4** présente le test LUMIPROBE 24, méthode alternative de détection de *Listeria monocytogenes* dans différentes matrices alimentaires.

**Q6.** Schématiser l'édifice obtenu à l'échelle moléculaire dans le cas d'un résultat positif avec la méthode alternative LUMIPROBE 24.

**Q7.** Montrer les avantages de la méthode alternative LUMIPROBE 24 par rapport à la méthode de référence.

## 2. Mise en place d'un nouveau protocole de décontamination des surfaces

L'entreprise souhaite remplacer le produit désinfectant à base d'ammoniums quaternaires (QUATAL®) par des bactériophages. L'utilisation de phages spécifiques de *Listeria monocytogenes* est expérimentée pour réduire les populations de *Listeria monocytogenes* présentes sous forme de biofilm sur les surfaces de polypropylène (PP) et d'acier inoxydable (SS) utilisées dans les étapes de préparation du beurre.

Les suspensions de phages utilisées doivent être ajustées à  $3,5 \cdot 10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup>.

Le **document 5** présente un protocole de détermination du titre de deux suspensions de phages H387 et les résultats obtenus.

**Q8.** Calculer le titre des deux suspensions de phages H387 et choisir celle utilisée pour réaliser les tests de décontamination des surfaces.

Le **document 6** présente le protocole et les résultats des tests de décontamination des surfaces contaminées par une souche de *Listeria monocytogenes* en présence ou en absence de phages.

**Q9.** Analyser les résultats obtenus pour évaluer l'efficacité de la décontamination dans les différents cas étudiés.

Le **document 7** présente le protocole et les résultats des tests de décontamination des surfaces contaminées par *Listeria monocytogenes* en absence et en présence de QUATAL® (ppm) à la concentration utilisée par l'entreprise.

**Q10.** Analyser les résultats obtenus.

**Q11.** Argumenter le choix fait par l'entreprise d'utiliser les phages pour décontaminer les surfaces utilisées lors de la fabrication du beurre.

Malgré ces résultats, les entreprises de production alimentaire n'utilisent pas massivement cette méthode de décontamination de surface.

**Q12.** Proposer des éléments d'explication limitant l'usage des bactériophages.

## 3. Réalisation de test de croissance de *Listeria monocytogenes* dans le beurre cru fermier

Des tests de croissance selon la norme NF EN ISO 20976-1:2019 sont réalisés par l'entreprise de fabrication de beurre afin d'évaluer la capacité de croissance de *Listeria monocytogenes* dans le beurre.

Le **document 8** présente les tests de croissance réalisés.

**Q13.** Calculer le potentiel de croissance ( $\Delta$ ) pour les trois lots étudiés et conclure.

Le **document 9** décrit les caractéristiques morphologiques et culturelles de *Listeria monocytogenes*.

**Q14.** Dédurre, à partir de ses caractéristiques culturelles, les termes adaptés pour qualifier *Listeria monocytogenes*.

**Q15.** Expliquer le développement de *Listeria monocytogenes* dans le beurre cru fermier de l'entreprise sachant qu'il présente les caractéristiques physicochimiques suivantes :

$$A_w = 0,91 \text{ et un pH} = 6,5.$$

**4. Réalisation d'un test de croissance de *Listeria monocytogenes* pour optimiser les conditions de conservation du beurre cru fermier**

Les critères microbiologiques imposent au fabricant l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 g de beurre en fin de production, et une limite microbiologique de 100 UFC par gramme de beurre pendant la durée de conservation. Un test est réalisé pour suivre l'évolution dans le beurre de *Listeria monocytogenes* inoculée de manière volontaire et contrôlée afin de vérifier les conditions de conservation du beurre (durée de 50 jours et une température de 4 °C). Le **document 10** présente le protocole et les résultats de ce test.

**Q16.** Identifier les différentes phases de la croissance et déterminer la durée de chacune.

**Q17.** Sachant que  $\text{Log}_{10} 2 = 0,3$ , estimer graphiquement le temps de génération et en déduire la vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle. Présenter la méthode et le calcul utilisés.

**Q18.** Analyser les résultats obtenus pour proposer une adaptation éventuelle des conditions de conservation du beurre cru fermier produit par l'entreprise.

**DOCUMENT 1 : Extraits du règlement 2073/2005 de la commission européenne concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires**

Extrait 1 : article 2

Article 2

**Définitions**

- a) «micro-organismes» les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites microscopiques, ainsi que leurs toxines et métabolites;
- b) «critère microbiologique» un critère définissant l'acceptabilité d'un produit, d'un lot de denrées alimentaires ou d'un procédé, sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de micro-organismes, et/ou de la quantité de leurs toxines/métabolites, par unité(s) de masse, volume, surface ou lot;
- c) «critère de sécurité des denrées alimentaires» un critère définissant l'acceptabilité d'un produit ou d'un lot de denrées alimentaires, applicable aux produits mis sur le marché;
- d) «critère d'hygiène du procédé» un critère indiquant l'acceptabilité du fonctionnement du procédé de production. Un tel critère n'est pas applicable aux produits mis sur le marché. Il fixe une valeur indicative de contamination dont le dépassement exige des mesures correctives destinées à maintenir l'hygiène du procédé conformément à la législation sur les denrées alimentaires;

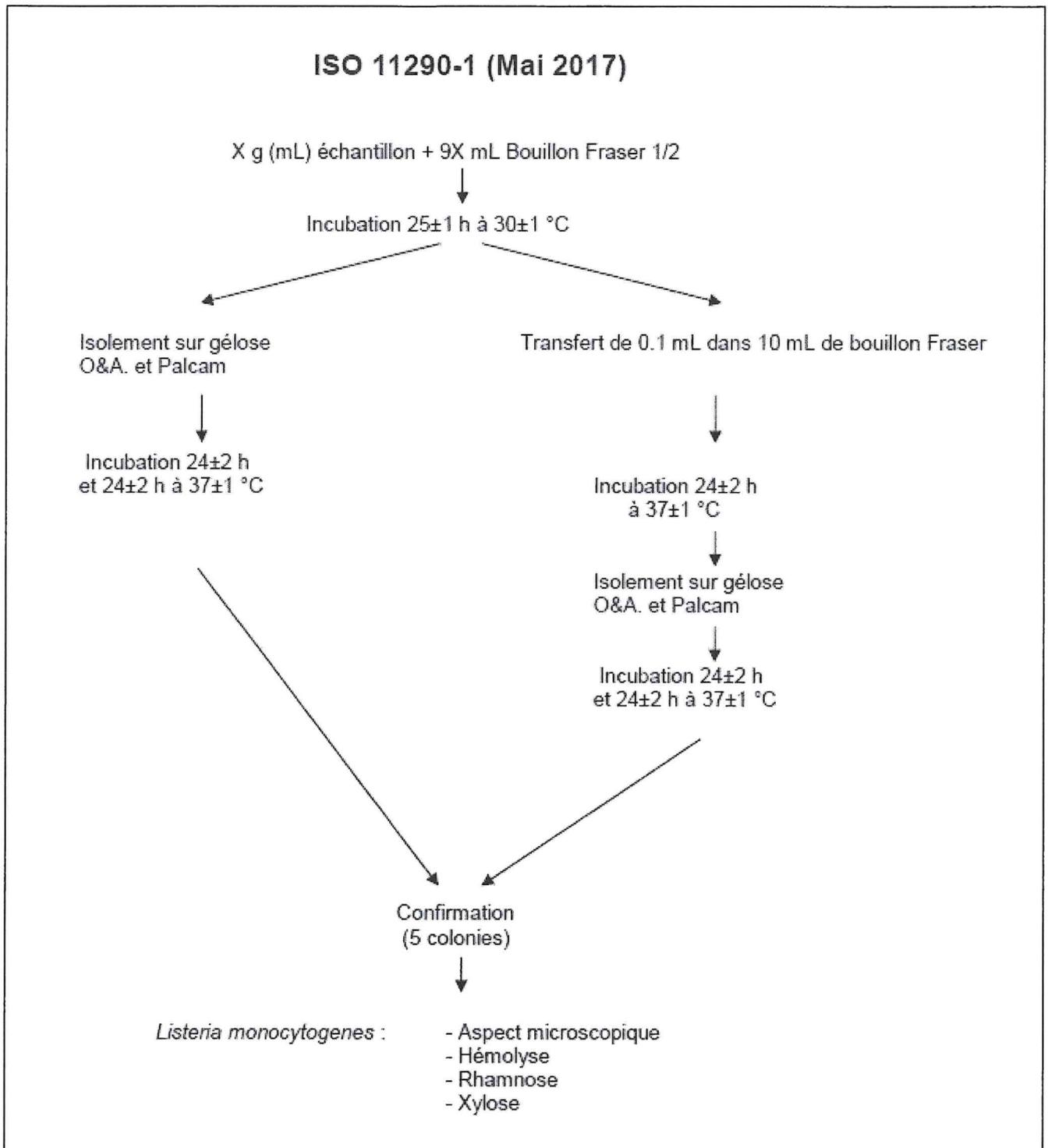
Extrait 2 : début de l'annexe 2

**Chapitre 1 Critères de sécurité des denrées alimentaires**

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/toxines, métabolites	Plan d'échantillonnage (1)		Limites (2)		Méthode d'analyse de référence (3)
		n	c	m	M	
Denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées aux nourrissons et denrées alimentaires prêtes à être consommées destinées à des fins médicales spéciales (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Absence dans 25 g		EN/ISO 11290-1
►C4 Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales ◀	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)
		5	0	Absence dans 25 g (7)		EN/ISO 11290-1
►C4 Denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales ◀ (8) (9)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)

Source : RÈGLEMENT (CE) N o 2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) ; JO L 338 du 22.12.2005, p. 1.

**DOCUMENT 2 : Protocole général de la méthode de référence de recherche de *Listeria monocytogenes***



Source : extrait de la norme EN ISO 11290-1 : 2017 – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : Méthode de recherche.

### **DOCUMENT 3 : Composition de la gélose ALOA (O&A)**

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.  
Pour 1 litre de milieu :

<b>CONSTITUANTS</b>	<b>QUANTITÉS</b>
Digestat enzymatique de tissu animal	18 g
Digestat enzymatique de caséine	6 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	2 g
Pyruvate de sodium	2 g
Glycérophosphate de magnésium	1 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Chlorure de lithium	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Hydrogénophosphate disodique anhydre	2,5 g
X-glucoside (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\alpha$ -D-glucopyranoside)	0,05 g
Acide nalidixique	0,02 g
Ceftazidime	0,02 g
Polymixine B	76700 U
Amphotéricine B	0,01 g
Phosphatidylinositol	2 g
Agar agar bactériologique	13,5 g
Eau	qsp 1 L
pH du milieu 7,2 +/- 0,2	

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* sont de couleur bleue vert entourées d'un halo opaque.

Source : Fiche technique Biomérieux.

## **DOCUMENT 4 : Présentation générale de la méthode alternative LUMIPROBE 24 de recherche de *Listeria monocytogenes* en microplaque**

Le test LUMIPROBE 24 *Listeria monocytogenes* est basé sur une réaction d'hybridation de sondes nucléiques en phase solide. L'ARN ribosomal de la bactérie cible est libéré par lyse cellulaire et capturé par un oligonucléotide spécifique fixé sur un support inerte (tube ou puits de microplaque). L'ARN ribosomal ainsi capturé est hybridé avec un deuxième oligonucléotide marqué qui permettra la révélation par une réaction de chimiluminescence.

### **ÉTAPE 1 : ENRICHISSEMENT**

25 g (mL) d'échantillon + 225 mL de bouillon RM préchauffé.

Incubation ( $37 \pm 1$ ) °C de ( $26 \pm 4$ ) heures.

### **ÉTAPE 2 : LYSE CELLULAIRE**

Transfert de 40 µL du bouillon RM incubé dans 40 µL de tampon de lyse.

Incubation ( $37 \pm 1$ ) °C de 15 minutes sous agitation (500 tr/min).

### **ÉTAPE 3 : HYBRIDATION**

Ajouter 90 µL de tampon d'hybridation et incubé 45 minutes à ( $50 \pm 1$ ) °C.

Rincer 2 fois puis laver 2 fois avec le tampon de lavage.

### **ÉTAPE 4 : RÉACTION AVEC LE CONJUGUÉ**

Ajouter 100 µL de solution de conjugué et incubé 15 minutes à ( $37 \pm 1$ ) °C sous agitation (500 tr/min).

Laver 4 fois avec le tampon de lavage.

### **ÉTAPE 5 : AJOUT DU SUBSTRAT**

Ajouter 100 µL de substrat et incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Lire les résultats au moyen d'un luminomètre.

Source : *Étude de validation Lumiprobe 24 Listeria monocytogenes pour la détection de Listeria monocytogenes*, <https://nf-validation.afnor.org/> (en ligne) consulté le 12 10 2022.

### **Extrait de la documentation commerciale**

Using rRNA provides a specific and sensitive molecular biology method for the detection of pathogenic bacteria in food and environmental samples.

After only 22 hours enrichment of the sample in RM medium, *LUMIPROBE 24* is an easy to run method, suitable for food industry laboratories as the microplate version requires only 4 pipetting steps. Additionally, automation frees 2 hours of technician time and brings reliability to all the steps.

*LUMIPROBE 24* method, with the luminometer, is a fast and easy in-house method for food industry laboratories to confirm the absence of pathogenic bacteria in their products, with a working time reduced to 20 minutes for 96 samples.

Source : *Europrobe : 24 h Listeria and Salmonella Detection in food matrices using rRNA based LUMIPROBE 24.*

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2023
U32 - Microbiologie et technologies d'analyse	Code : 23BAE3MT Page : 8/13

## **DOCUMENT 5 : Dénombrement des phages H387 dans deux suspensions par la méthode des plages de lyse**

### **1- Préparation des dilutions des suspensions de phages**

Préparer une série de dilutions décimales des suspensions phagiques jusqu'à  $10^{-11}$  sous un volume final de 1 mL. Le diluant utilisé est l'eau physiologique.

### **2- Dénombrement des plages de lyse par la technique des spots ou microgouttes**

- Couler 60 mL de gélose Mueller Hinton dans deux boîtes de Petri. Laisser solidifier.
- Mélanger 0,4 mL de *Listeria monocytogenes* à 12 mL de Top Agar (milieu Mueller Hinton semi-gélosé en surfusion à 50 °C).
- Couler le mélange sur les géloses. Laisser solidifier.
- Dans chaque boîte, déposer 10  $\mu$ L de chaque dilution de phages (de  $10^{-5}$  à  $10^{-11}$ ) à la surface du milieu, en réalisant des spots bien séparés. Doubler chaque essai.
- Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.
- Dénombrer les plages de lyse.

### **3- Résultats obtenus dans les suspensions 1 et 2 de phages H387 après incubation**

	Suspension 1		Suspension 2	
Dilution de la suspension de phage H387	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Plages de lyse (Résultats des 2 essais)	36 34	4 3	33 37	3 4

### **4- Exploitation des résultats expérimentaux**

Retenir les valeurs de 2 dilutions successives présentant :

- au moins 1 boîte ayant au minimum 1 plage de lyse ;
- et un nombre de plages de lyse inférieur à 100 par boîte.

Calculer le titre de la suspension phagique en utilisant la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma PL}{V \cdot (n1 + 0,1 \cdot n2) \cdot d}$$

$N$  : Titre de la suspension phagique en UFP par millilitre.

$\Sigma PL$  : Somme des plages de lyse (PL) dénombrées sur toutes les boîtes retenues des 2 dilutions successives.

$V$  : Volume de l'inoculum déposé sur chaque boîte en mL.

$n1$  : Nombre de boîtes retenues à la dilution la plus faible.

$n2$  : Nombre de boîtes retenues à la dilution suivante.

$d$  : Dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue.

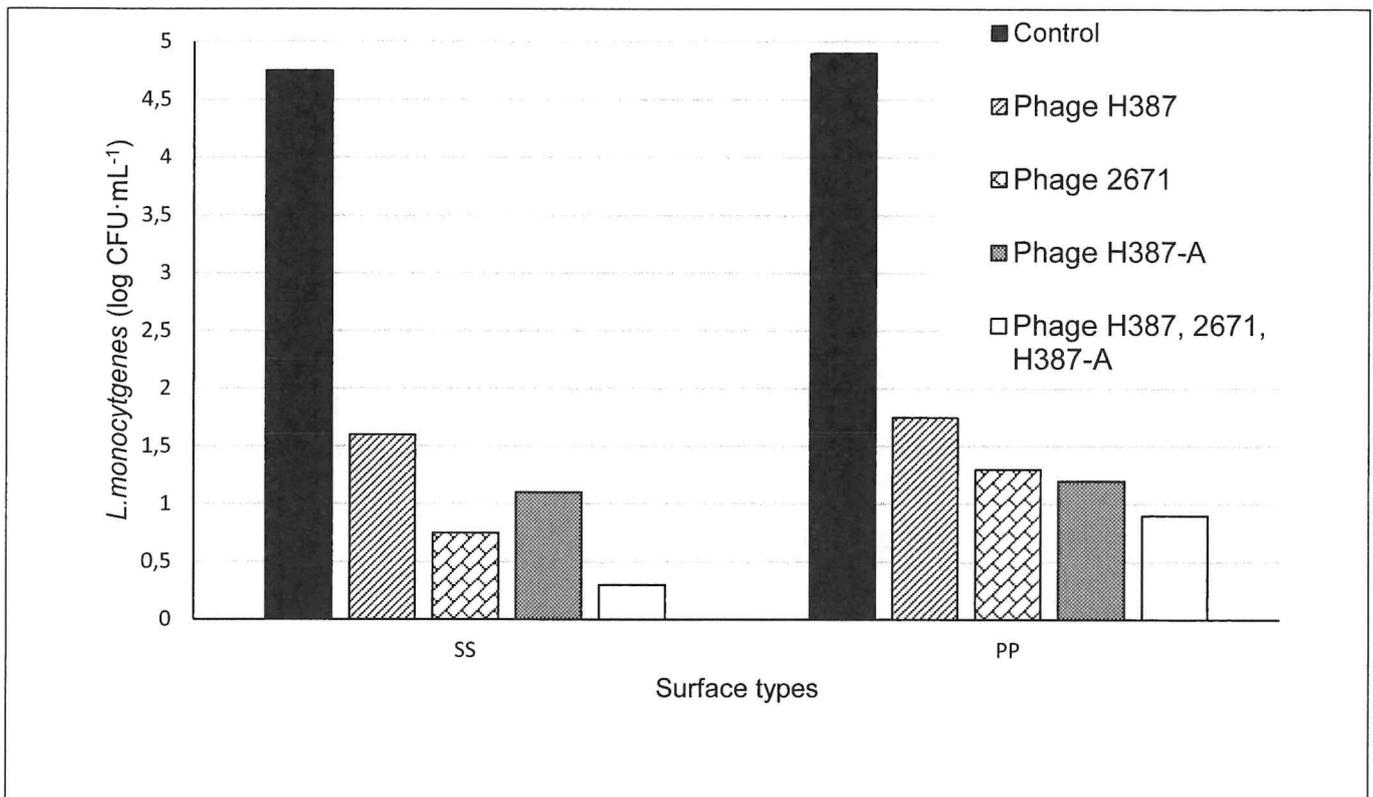
## **DOCUMENT 6 : Protocole et résultats de tests réalisés sur des surfaces contaminées par *Listeria monocytogenes* en présence ou absence de phages**

### **Protocole**

The cylinders were contaminated by immersion for 60 min at 26 °C into fresh cultures of *L. monocytogenes* ( $3 \cdot 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>). The cylinders were transferred into 5 mL each of the following decontaminating solutions: (i) pure suspensions of each phage, (ii) a mixture of equal quantities of the three phages. After a decontamination period of 1 h, recovered cells were enumerated by plating on TSY agar.

### **Résultats**

Recovery of adhering *L. monocytogenes* cells from contaminated SS and PP surfaces after exposure for 1h to listeriophages ( $3,5 \cdot 10^8$  PFU·mL<sup>-1</sup>).



### **Légendes :**

SS = surfaces en acier inoxydable

PP = surfaces en polypropylène

Source : ROY Brigitte, *Bactériophages de Listeria : formulation d'un bio-assainisseur et production par immobilisation cellulaire*, Thèse, université de Laval, 2018 (en ligne) <https://corpus.ulaval.ca/> consulté le 12 10 2022.

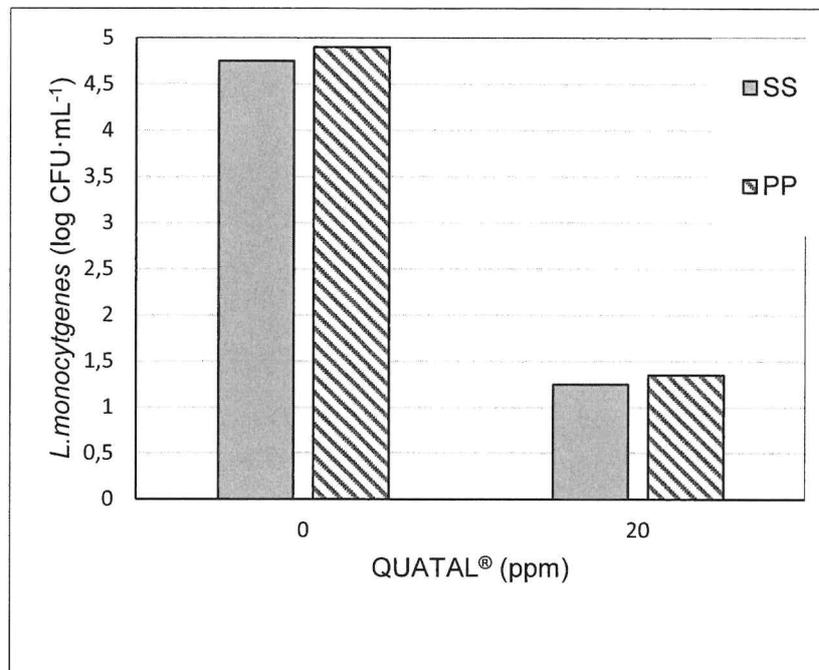
## DOCUMENT 7 : Tests de décontamination de surface par le QUATAL®

### Protocole

The cylinders were contaminated by immersion for 60 min at 26 °C into fresh cultures of *L. monocytogenes* ( $3 \cdot 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>). The cylinders were transferred into 5 mL of 20 ppm solution of QUATAL®. After a decontamination period of 1 h, recovered cells were enumerated by plating on TSY agar.

### Résultats

Recovery of *L. monocytogenes* from contaminated SS and PP surfaces after exposure for 1 h to 20 ppm of QUATAL®.



### Légendes :

SS = surfaces en acier inoxydable

PP = surfaces en polypropylène

ppm : partie par million

Source : ROY Brigitte, *Bactériophages de Listeria : formulation d'un bio-assainisseur et production par immobilisation cellulaire*, Thèse, université de Laval, 2018 (en ligne) <https://corpus.ulaval.ca/> consulté le 12 10 2022.

## **DOCUMENT 8 : Tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance (d'après la norme NF EN ISO 20976-1 - Avril 2019 Microbiologie de la chaîne alimentaire)**

**Objectif du test** : évaluer la capacité de l'aliment à permettre la croissance de la population microbienne cible.

**Critère décisionnel** : l'aliment permet la croissance si un potentiel de croissance supérieur à  $0,5 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  est observé.

### **Protocole**

Trois lots ont été inoculés simultanément avec une souche de *Listeria monocytogenes*. Cinq points d'échantillonnage ont été réalisés (incluant  $t_0$  et  $t_{\text{final}}$ ) dans les conditions de conservation (association du temps et de la température) reproduisant les conditions de distribution, d'entreposage et d'utilisation raisonnablement prévisibles (incluant des conditions de temps et de température abusives) auxquelles l'aliment pourrait être soumis entre sa fabrication et sa consommation finale.

### **Résultats du test de quantification du potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* dans le beurre**

Niveau d'inoculation ciblé :  $2 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$

	$\log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$				
	Temps 0	T 5 jours	T 10 jours	T 15 jours	T 20 jours
Lot 1	2,00	3,98	4,28	4,23	4,18
Lot 2	1,70	3,90	4,28	4,71	4,60
Lot 3	2,18	4,00	4,36	4,51	5,00
<b>Ecart-type</b>	<b>0,20</b>				

### **Validation**

Le test de croissance est rejeté si au temps 0 ( $t_0$ ) l'écart-type (dû à l'incertitude de mesure et à l'hétérogénéité du taux de contamination) est supérieur à la limite de  $0,3 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ .

### **Exploitation**

Le potentiel de croissance  $\Delta$  doit être calculé pour chaque lot, c'est la différence entre le logarithme décimal de la concentration la plus élevée de la population microbienne cible ( $\log_{\text{max}}$ ) et le logarithme décimal de la concentration initiale de cette population microbienne ( $\log_i$ ).

$$\Delta = \log_{\text{max}} - \log_i$$

## **DOCUMENT 9 : Caractéristiques de *Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* est un bacille à Gram positif, non sporulé. La croissance de *L. monocytogenes* est possible entre  $-1,5$  et  $45$  °C, avec une plage optimale de  $30-37$  °C. Du fait de sa croissance possible aux environs de  $0$  °C, *L. monocytogenes* peut se développer lentement dans des aliments réfrigérés. *L. monocytogenes* se développe dans une large amplitude de pH, de  $4,0$  à  $9,6$  avec un optimal à pH  $7$ . Comme la plupart des espèces bactériennes, *L. monocytogenes* se développe de façon optimale à une activité de l'eau ( $a_w$ ) de  $0,97$ . Cependant, *L. monocytogenes* peut également se multiplier à une  $a_w$  de  $0,90$  et survivre de façon prolongée à une  $a_w$  de  $0,81$ . *L. monocytogenes* est modérément tolérante au sel et se développe à une concentration maximale de  $13-14$  % en chlorure de sodium.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2023
U32 - Microbiologie et technologies d'analyse	Code : 23BAE3MT Page : 12/13

## **DOCUMENT 10 : Tests de croissance pour estimation des paramètres cinétiques de la croissance**

**Objectif du test :** évaluer, déterminer et optimiser les conditions de conservation microbologique (qualité et sécurité) de l'aliment.

### **Protocole**

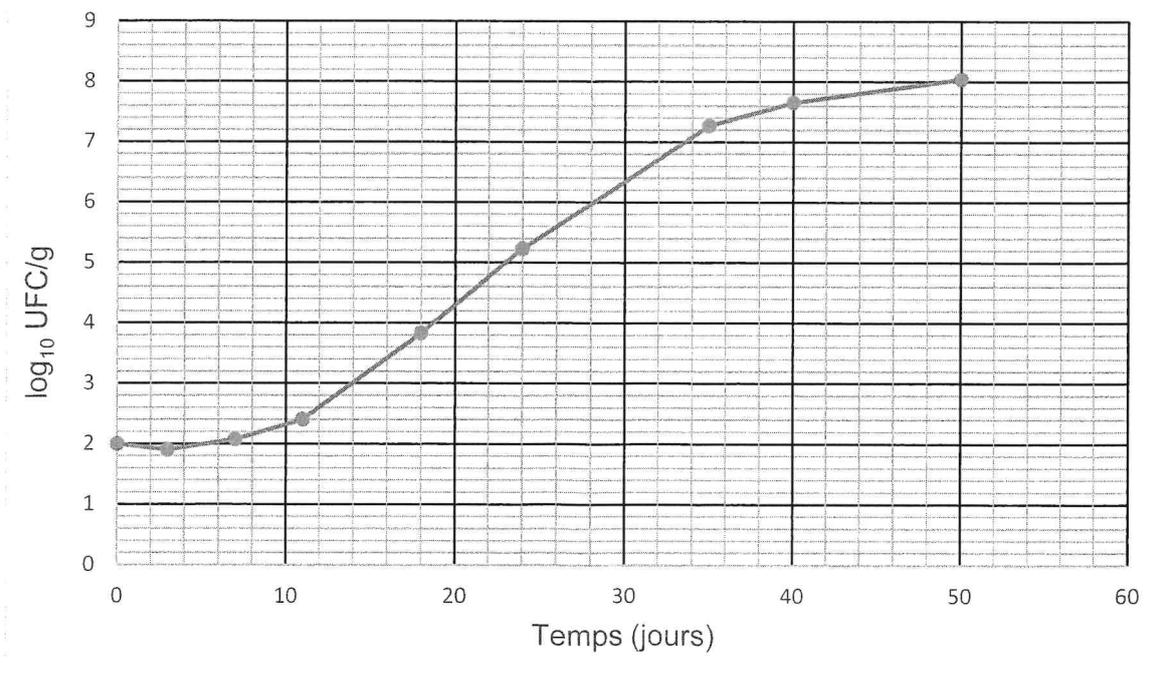
Le test de croissance est réalisé sur du beurre inoculé avec une souche de *Listeria monocytogenes*. Les dénombrements sont réalisés à 0, 3, 7, 11, 18, 24, 35, 40 et 50 jours après inoculation de la population microbienne pour une température à 4 °C.

### **Résultats du test de croissance**

Les points expérimentaux sont fournis dans le tableau ci-dessous. La cinétique de croissance microbienne obtenue est présentée dans la figure 1.

Temps (jours)	$\log_{10}$ UFC·g <sup>-1</sup>
0	2
3	1,9
7	2,07
11	2,4
18	3,83
24	5,23
35	7,27
40	7,65
50	8,04

**Figure 1 : Cinétique de croissance microbienne de *Listeria monocytogenes***



Source : norme NF EN ISO 20976-1 - Avril 2019 Microbiologie de la chaîne alimentaire.

