Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

EPREUVE E3 – UNITE U32
MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2018

_____

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

_____

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais-français

L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Tout autre matériel est interdit.

Compétences évaluées :

C2.1. Analyser une problématique	**13 points**
C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents	**12 points**
C2.4. Présenter des informations, analyser, interpréter, valider des résultats	**19 points**
C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés	**13 points**

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, qualité des tableaux …) seront évalués à hauteur de 3 points sur 60.

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.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Altération des jus de fruits et démarche qualité

Produits et conditionnés sans conservateurs, les jus de fruits sont dans certaines circonstances vulnérables à des contaminations au cours de leur production.

Parmi les risques de la filière des jus de fruits, dont la production industrielle est en forte croissance, sont particulièrement redoutés :

- Le genre *Alicyclobacillus* est souvent associé à une molécule malodorante affectant la qualité marchande des jus de fruit. Ces bactéries ont affecté en particulier la production de jus de fruits en Espagne en 2013, suscitant alors la vigilance des industriels français.
- Le dépassement de la concentration en patuline synthétisée par des moisissures contaminantes, au-delà du seuil de *50 µg / kg,* qui engendre des problèmes de santé.

I. *Alicyclobacillus,* bactérie d'altération des jus de fruits

L'altération se manifeste dès lors que la bactérie se développe dans la boisson en produisant une quantité élevée de gaïacol, une molécule malodorante, et du 2,6 dibromophénol qui donne un goût âcre à la boisson.

Deux espèces sont plus particulièrement incriminées : *Alicyclobacillus acidoterrestris*, qui induit la détérioration la plus forte, et *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

I.1. Taxonomie et caractérisation des souches d'altération

Dans la première édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *Alicyclobacillus* était connu sous le nom de genre *Bacillus*. Grâce à l'étude de l'ARNr 16S, ce groupe très hétérogène a été réorganisé phylogénétiquement, et le genre *Alicyclobacillus*, est apparu en 1992. Les principales caractéristiques de ce genre bactérien sont mentionnées sur le **document 1**.

Q1. *Alicyclobacillus* a des similitudes avec le genre *Bacillus*. Parmi les caractères soulignés, identifier le caractère phénotypique qui peut permettre de différencier ces deux genres.

Q2. Qualifier ces germes d'altération en fonction de leurs conditions de culture.

Le **document 2** présente le dendrogramme montrant la relation phylogénétique des bactéries Gram +. Ce dendrogramme a montré la nécessité de créer un nouveau genre *Alicyclobacillus.*

Q3. Expliquer à quoi correspond un groupe phylogénétique. Argumenter la création du nouveau genre *Alicyclobacillus,* considérant qu'en-dessous d'un pourcentage de similitude de 87 %, deux souches bactériennes sont classées dans deux genres différents. Vérifier également que ces trois espèces appartiennent au même genre.

Pour rechercher *Alicyclobacillus* dans les jus de fruits, les acteurs de la filière utilisent le milieu de culture *BAT Agar* (Merck), présenté dans le **document 3.**

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Q4. Identifier le rôle de chaque constituant du milieu. La souche étant chimio-organo-hétérotrophe, justifier l'utilisation de ce milieu par rapport à son type trophique.

Montrer en quoi le milieu *BAT-Agar* est adapté aux conditions de culture d'*Alicyclobacillus*.

Analyser le logigramme présentant la démarche de détection d'*Alicyclobacillus.*

Expliquer en quoi la culture sur *PC-Agar* conduit à rendre un résultat négatif.

Lorsque la bactérie altérante *Alicyclobacillus* est détectée, on détermine sa capacité à produire du gaïacol. Le protocole est présenté dans le **document 4**.

Q5. Proposer la réalisation d'un témoin positif et d'un témoin négatif en précisant pour chacun leur composition et le résultat attendu.

I.2. Optimisation de la pasteurisation des jus de fruits

Le barème de pasteurisation classique des jus de fruit (72 °C pendant 15 s) permet de conserver les qualités organoleptiques et est sans effet sur les spores. Les industriels sont demandeurs d'un protocole de pasteurisation plus efficace.

Le **document 5** présente une micrographie d'une observation d'une suspension d' *Alicyclobacillus acidoterrestris* en contraste de phase.

Q6. Rappeler deux particularités de la spore expliquant la thermorésistance bactérienne. Montrer en quoi la micrographie illustre le caractère imperméable de la spore.

Le **document 6** présente une étude ayant abouti au calcul des temps de réduction décimale après avoir soumis la souche à différentes températures.

Q7. Expliquer le rôle du lysozyme en précisant son mode d'action moléculaire au niveau de la paroi.

Q8. Définir le temps de réduction décimale. Commenter les valeurs obtenues en montrant les conséquences de l'application de telles températures sur le jus de fruits.

La nisine, utilisée comme additif alimentaire, est un polypeptide antibactérien, qui agit sur les bactéries à Gram positif et sur certaines formes sporulées. Sa relative stabilité à la chaleur permet d'envisager de l'associer à un protocole de pasteurisation. Afin de se rapprocher d'un barème de pasteurisation classique, l'effet de la nisine est testé sur la thermorésistance des spores (résultat donné dans le **document 7**).

Q9. Commenter les résultats et conclure quant à l'utilisation de la nisine.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

II. Étude de la contamination par des moisissures productrices de patuline

II.1. Identification du risque sanitaire

La patuline est une molécule essentiellement mise en évidence dans les jus de pommes. Deux moisissures productrices de patuline sont particulièrement redoutées dans la filière : *Penicillium expansum* (principal producteur) et *Aspergillus clavatus.*

Leur aspect microscopique est présenté sur le **document 8.**

Q10. Préciser à quelle catégorie de molécule appartient la patuline et rappeler un risque majeur associé à son ingestion.

Q11. Légender les **photographies A** et **B** (reporter les numéros 1 à 4 et leur légende respective sur votre copie). Identifier chaque genre représenté en argumentant la réponse.

II.2. Lutte contre la prolifération des moisissures

Après la récolte, il est fréquent que les agriculteurs utilisent un fongicide, le thiabendazole (TBZ), pour éviter la prolifération de ces différentes moisissures. Son mode d'action est présenté sur le **document 9**.

Q12. Dégager les deux mécanismes d'inhibition du TBZ sur les moisissures. Expliquer pourquoi cette molécule ne peut en aucun cas être efficace sur les bactéries telles qu'*Alicyclobacillus*.

Afin de mieux lutter contre l'incidence de la patuline, les producteurs cherchent à déterminer les conditions optimales de stockage des fruits. Pour ce faire, une étude des principaux facteurs qui contribuent à la croissance de ces moisissures et à l'apparition de patuline est réalisée.

II.3. Évaluation de l'influence de la température sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum*

II.3.1. Essais *in vitro*

Dans un premier temps, on réalise la préparation d'un inoculum de *P. expansum,* dont la concentration est contrôlée à l'hématimètre. Cette étape est présentée sur le **document 10.**

Q13. Calculer la concentration initiale en spores de la suspension de *P. expansum* à partir de la numération en cellule de Neubauer puis **déterminer** la dilution à réaliser afin de procéder à l'ajustage souhaité.

Chaque expérience est ensuite conduite en inoculant centralement un milieu avec la suspension de spores précédemment ajustée. Le milieu choisi est le milieu agar Czapek et les températures testées sont : 4, 8, 16, 25 et 30 °C.

Q14. Argumenter le choix des températures testées, toujours en lien avec la filière de production de jus de fruit.

Base nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Les mesurages ont été effectués pour une période globale de quatorze jours. Les résultats sont présentés sur le **document 11.** Au cours de l'incubation,

- on mesure le diamètre du thalle (**document 11A**),
- on calcule le taux de croissance radiale en cm/jour (**document 11B**)
- on estime par HPLC la quantité de patuline produite sur le milieu gélosé (**document 11C**).

Q15. Exploitation des résultats :

- comparer l'influence de la température sur la croissance des thalles, d'après les courbes obtenues, afin de dégager les différences significatives,
- déterminer le comportement de cette souche vis-à-vis de la température,
- repérer les différences entre la croissance du germe et la toxinogénèse,
- conclure sur la température de stockage des pommes à préconiser.

II.3.2. Essais *in vivo*, sur diverses variétés de pommes

Afin d'évaluer la validité des résultats expérimentaux précédents en situation réelle pour des denrées alimentaires, trois pommes de variétés Golden Delicious, Granny Smith et Royal Gala ont été utilisées.

Le protocole et les résultats obtenus sont présentés sur le **document 12**.

Q16. Préciser le rôle et mode d'action de l'hypochlorite de sodium et **énoncer** deux paramètres à respecter pour garantir l'efficacité d'un tel traitement chimique.

Q17. Comparer l'effet du désinfectant sur la croissance de *P. expansum in vivo* et *in vitro* quelle que soit la température testée. Montrer que l'effet matrice sur la croissance de la moisissure est plus important à 8 °C qu'à 25 °C en présence d'hypochlorite de sodium à 2 %.

Bilan :

Q18. Pour conclure sur la filière et la prévention des dangers biologiques, proposer trois points critiques à surveiller, depuis les matières premières au produit fini.

Base Nationale des Sujets d'examens de l'enseignement professionnel

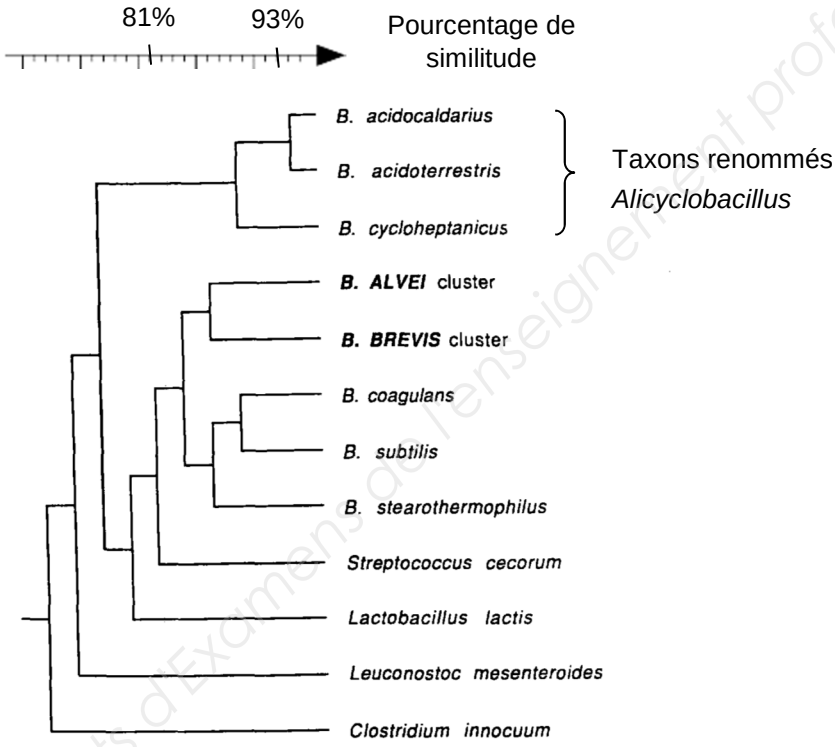
<u>DOCUMENT N°1</u> : Caractéristiques générales du genre *Alicyclobacillus*

Les bactéries du genre *Alicyclobacillus* sont des **<u>bacilles Gram +</u>** non pathogènes**, <u>sporulés</u>, <u>aérobies stricts</u>**, communément retrouvés dans la flore tellurique.

Ces bactéries cultivent entre 20 et 70 °C, avec un optimum d'environ 50 °C selon les souches et dans une gamme de pH comprise entre 2,0 et 6,0, avec un pH optimal moyen de 4,0.

<u>DOCUMENT N°2</u> : Dendrogramme montrant la relation entre les trois espèces du nouveau genre *Alicyclobacillus* par rapport aux membres du genre *Bacillus*

Le dendrogramme a été obtenu grâce au séquençage de l'ARNr16S.



<u>Source</u> : **Wisotzkey** et Al., IJSB, Avril 1992, p263-269, Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and Proposal for Creation of a New Genus, Alicyclobacillus gen. nov.

<u>DOCUMENT N° 3</u> : BAT Agar, recommended by the IFU (International Federation of Fruit Juice Producers)

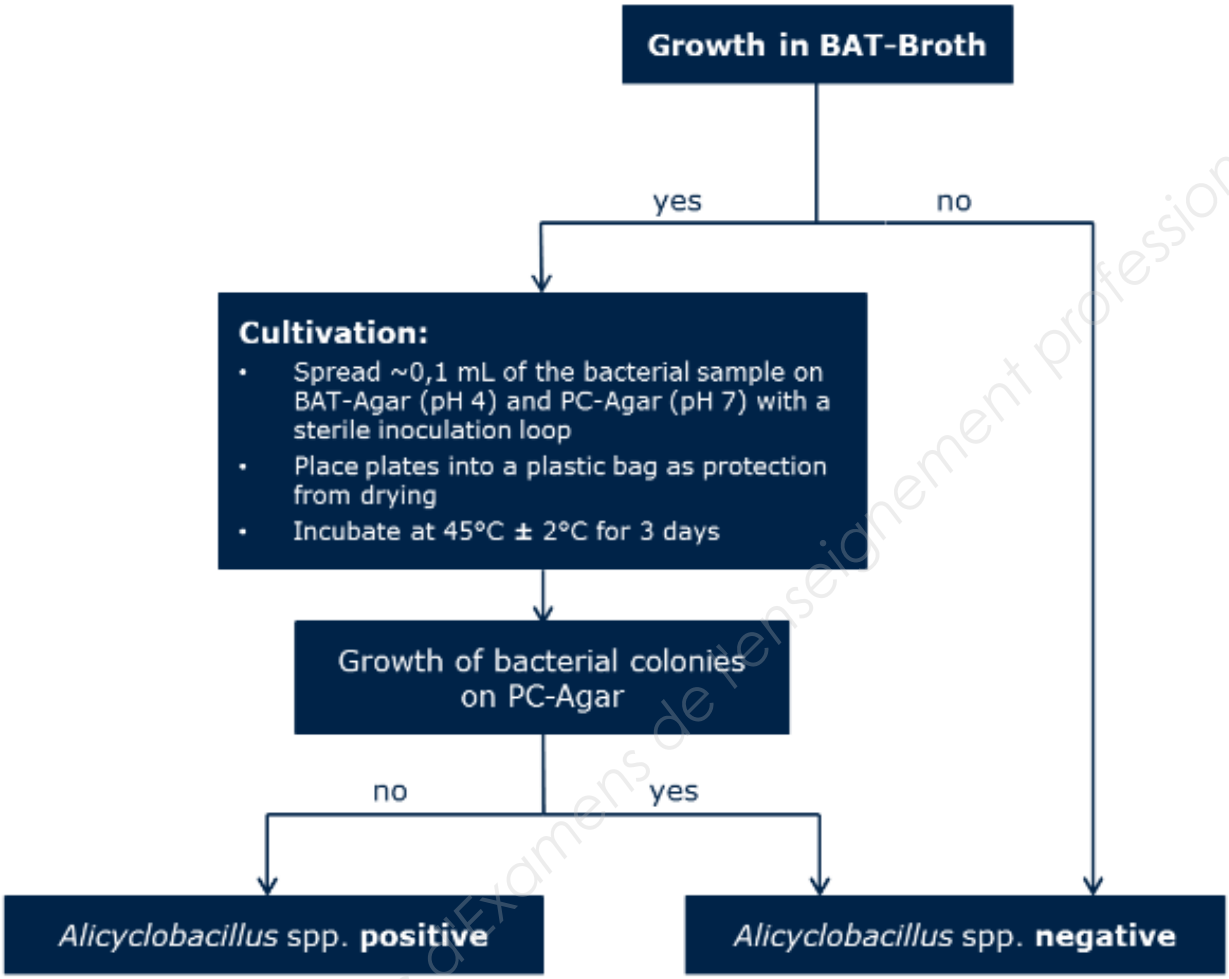
Medium for the detection of *Alicyclobacillus* spp in fruits juices and other beverages

<u>Typical composition of BAT Agar (g.L^{-1}) :</u>

- Yeast extract	2,0
- D(+) glucose	5,0
- Calcium chloride	0,25
- Magnesium sulfate	0,5
- Ammonium sulfate	0,2
- Potassium dihydrogenphosphate	3,0
- Agar-agar	18,0
- Trace Minerals solution	
- pH (à 25 °C)	4,0 ± 0,2

Base nationale des sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Suite document 3 :
Démarche de détection d'Alicyclobacillus (extrait de la fiche technique VWR)



DOCUMENT N° 4 : Confirmation for guaiacol producing *Alicyclobacillus* by peroxidase test

Alicyclobacillus, which can spoil products by producing guaiacol, can be specifically identified by the following method : 26 ACB Best Practice Guideline - July 2008| AIJN :

- prepare YSG broth and add vanillic acid
- inoculate a fresh colony into the tubes
- incubate, shaking, at 45 °C for at least 3 hours, but over night is recommended
- add buffer, H_2O_2 and peroxidase solution to incubated tubes and mix well
- after 5 – 10 minutes, observe the change of colour by visual evaluation

The principle of the test is that guaiacol producing strains convert vanillic acid to guaiacol.

Guaiacol reacts with H_2O_2 and peroxidase to form tetraguaiacol which is a brown coloured complex.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

DOCUMENT N° 5 :

Phase-contrast micrograph of cells of *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. Cells were cultured on liquid BAM for 3 days at 55°C



(d'après http://ijs.microbiologyresearch.org)

DOCUMENT N° 6 :

Étude de la thermorésistance des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* cultivé en jus d'orange concentré (pH = 3,68) sans nisine

Préparation de la suspension de spores : une suspension de spores a été réalisée. La souche sous forme végétative est inoculée dans un milieu de sporulation ; après centrifugation et lavage, du lysozyme est ajouté au culot, puis la suspension de spores est obtenue après un dernier lavage.

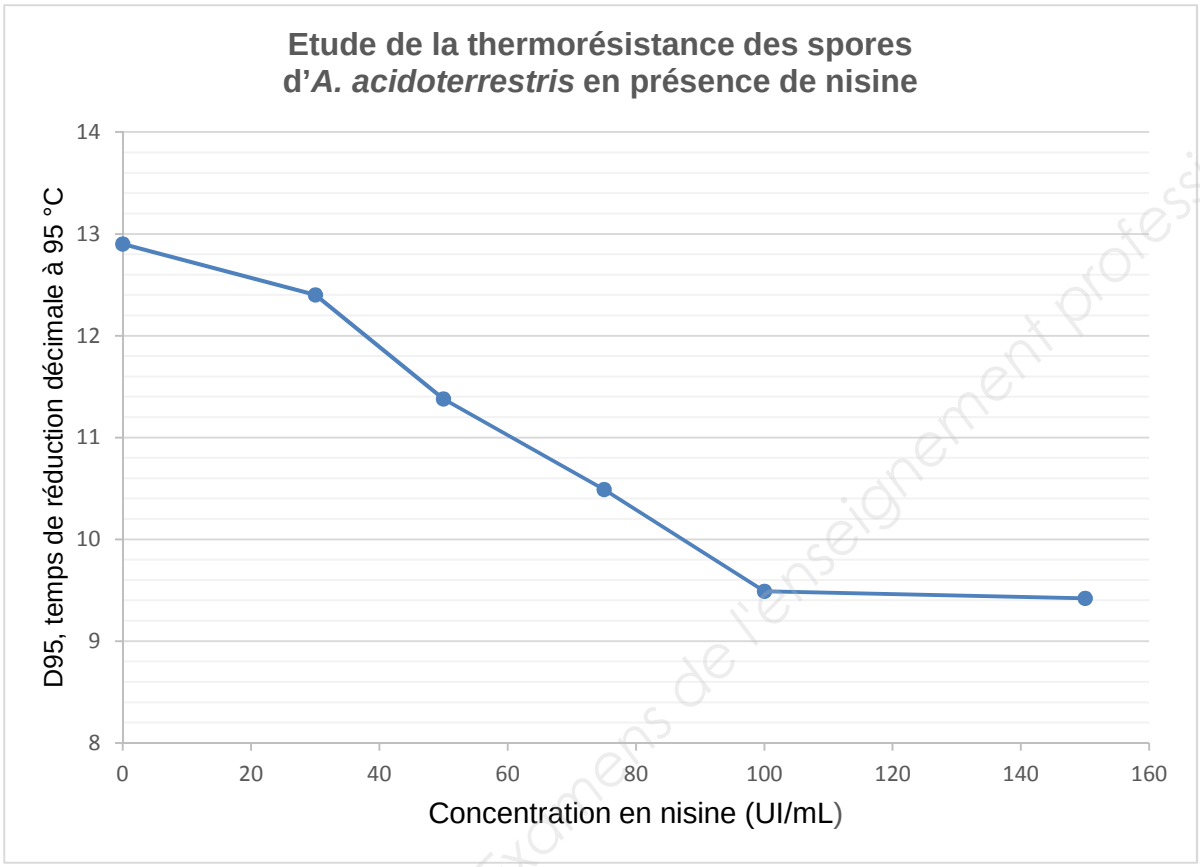
Résultats obtenus :

Température en °C	D, temps de réduction décimale en min
92	25,5
95	12,9
98	6,1
105	2,3

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

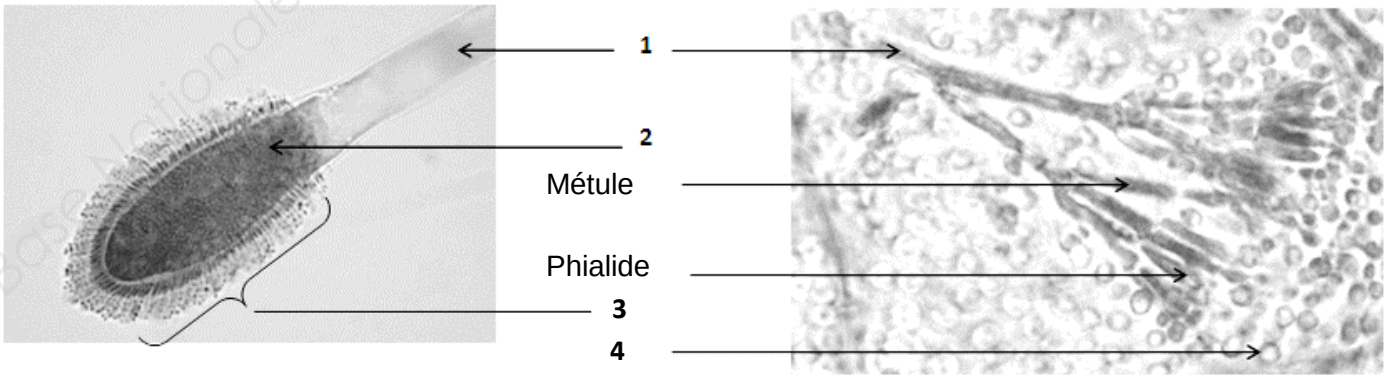
DOCUMENT N°7 :

Étude de la thermorésistance des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 cultivé en jus d'orange concentré (pH = 3,68) en présence de nisine. Résultats à 95 °C.



Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

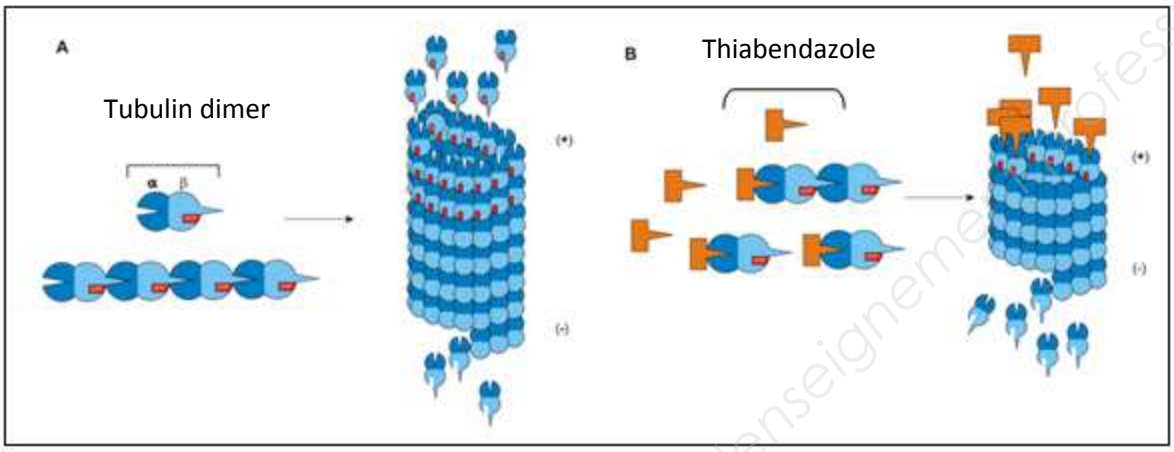
DOCUMENT N°8 : Aspects microscopiques de deux moisissures redoutées dans la filière



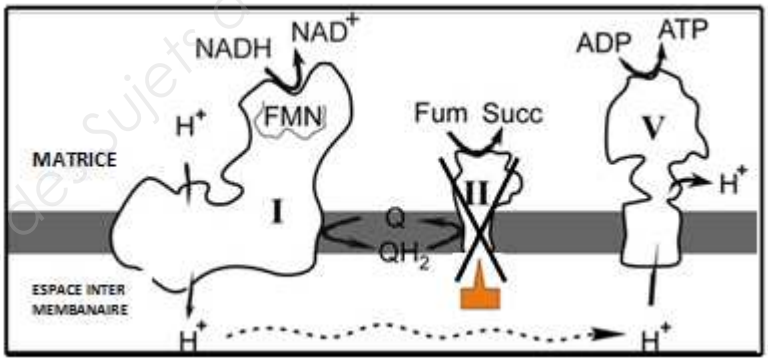
8A **8B**

<u>DOCUMENT N°9</u> : Cibles et modes d'action du thiabendazole (TBZ) dans une cellule fongique. ***A : sans TBZ ; B : avec TBZ***

Protéines du cytosquelette = dimères de tubuline



Chaîne respiratoire mitochondriale



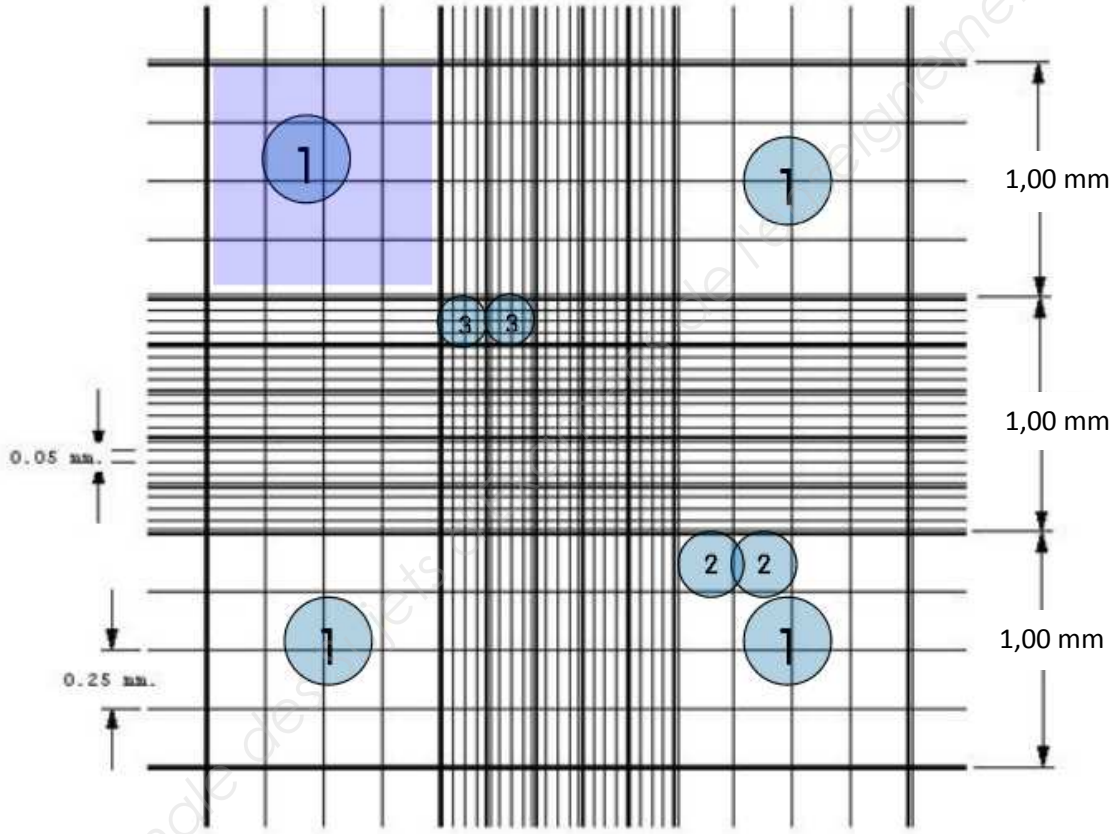
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

<u>DOCUMENT N° 10</u> : Préparation de l'inoculum de *P. expansum*

La souche étudiée est cultivée sur un milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) et incubée à 25 ° C durant 7 jours afin d'obtenir une culture fortement sporulante. La suspension conidienne a été préparée en lavant la surface de la culture fraîche avec 10 mL d'eau distillée stérile combinée à du tween 80 et en frottant doucement avec un écouvillon stérile. La concentration des spores a été déterminée par microscopie à l'aide d'une chambre de comptage Neubauer puis ajustée à 10^5 spores/mL.

Comptage à l'hématimètre de Neubauer

L'hématimètre est constitué d'un grand carré, subdivisés en 9 carrés moyens, notés n°1. Épaisseur de la lame 0,1 mm.

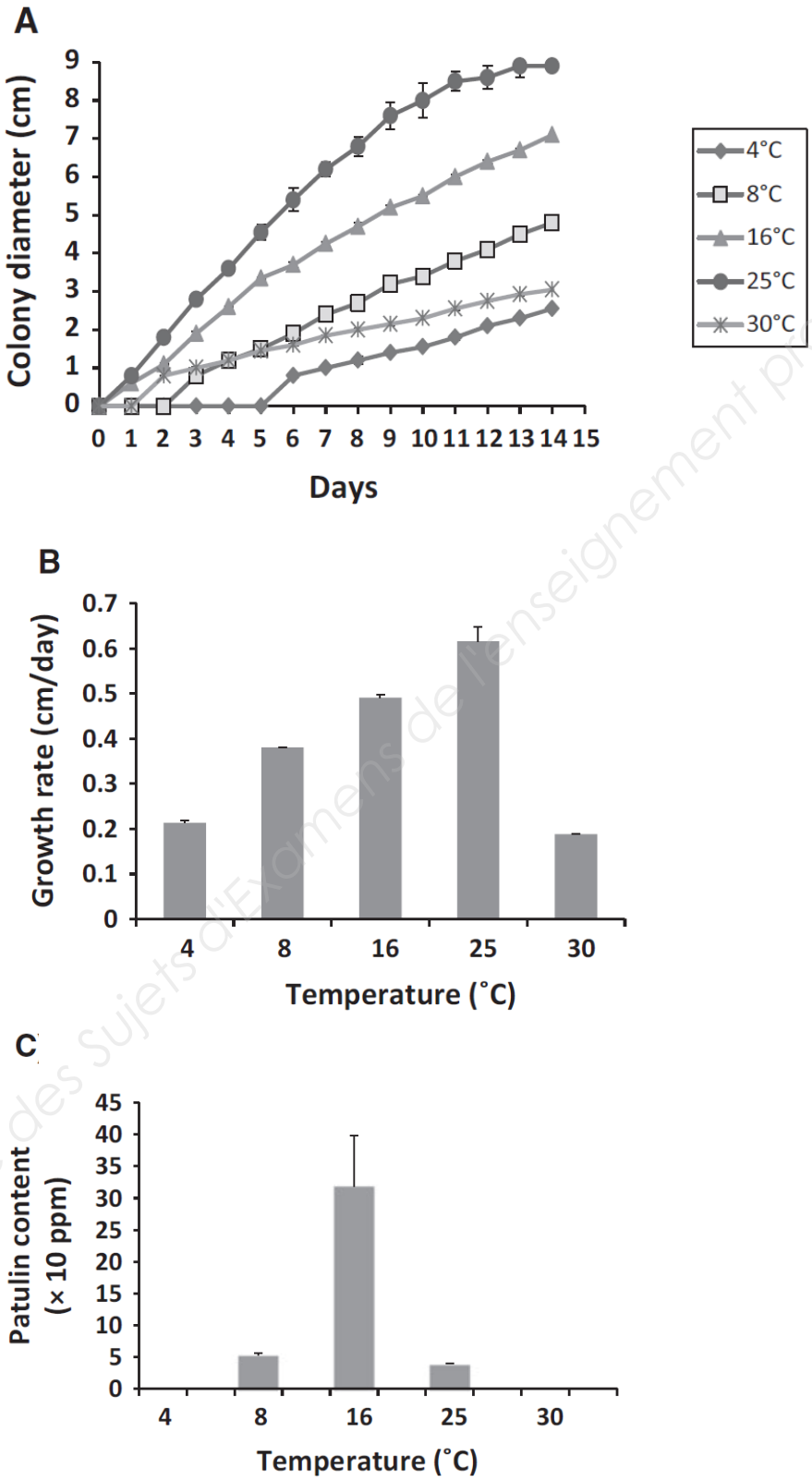


Unité de comptage : carré moyen ①	*Nombres de spores*
1er carré	***29***
2ème carré	***24***
3ème carré	***22***
4ème carré	***25***

d'après http://www.celeromics.com

Base Nationale des sujets de l'enseignement professionnel

<u>DOCUMENT N° 11</u> : Influence de la température sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum*



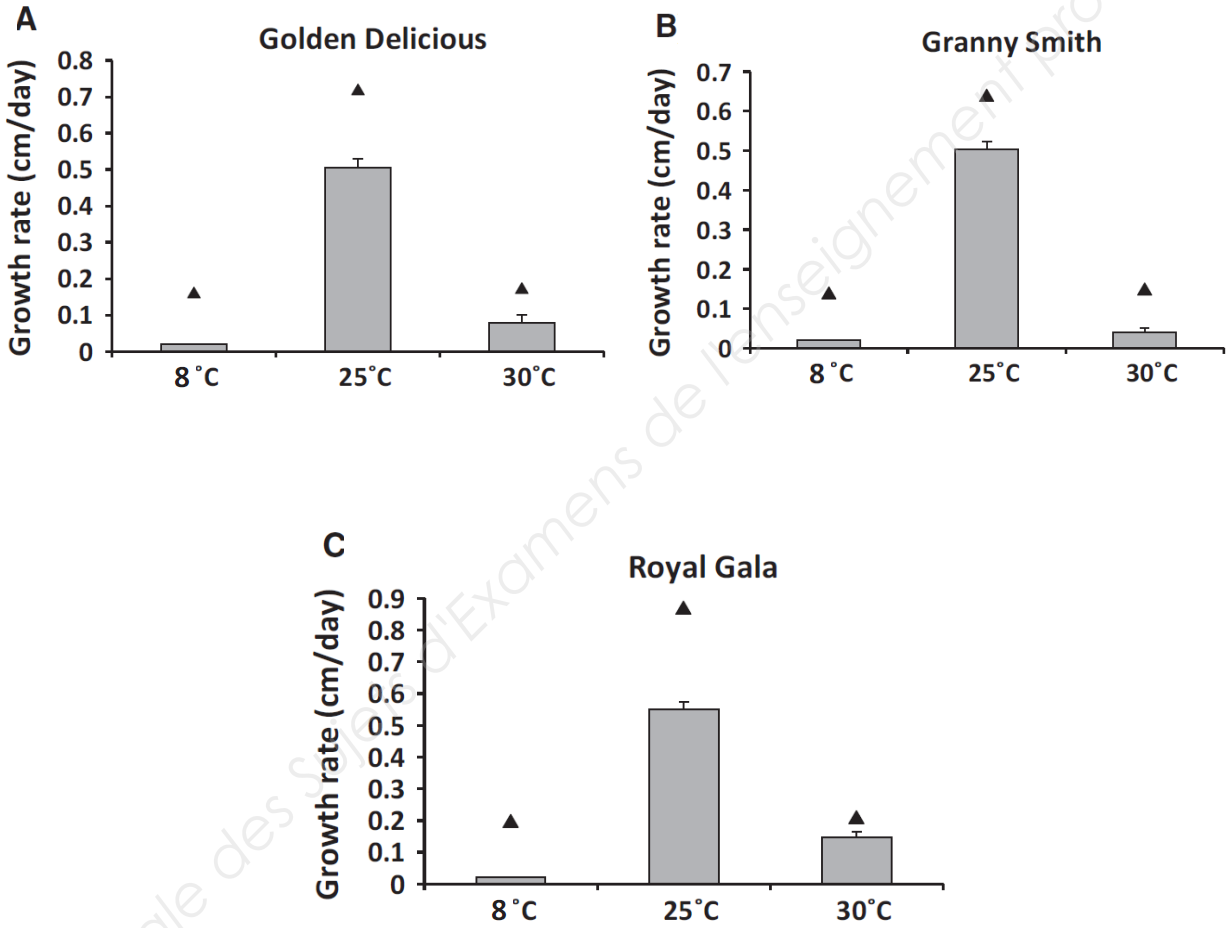
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

<u>Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of *Penicillium expansum* NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under different temperatures.</u>

Five different temperatures were tested (4, 8, 16, 25 and 30 °C). The results shown are the mean of three technical replicates for each condition.

<u>DOCUMENT N° 12</u> : Comparaison des résultats de la croissance de *P. expansum* obtenus sur des pommes à ceux obtenus sur milieux de culture en présence d'hypochlorite de sodium à 2%.

Les pommes sont traitées en surface à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % puis rincées à l'eau. Elles sont ensuite blessées en utilisant un cure-dent stérile à une profondeur d'environ 0,5 cm, et inoculées avec 10 µL de suspension conidienne de *P. expansum* à une concentration de 10^4 conidies / µL. Les pommes infectées ont été incubées pendant 2 semaines sous trois températures différentes (8 °C, 25 °C et 30 °C). Des analyses en double ont été effectuées sur chaque ensemble de conditions.



The experimental growth rate values are shown in histograms (■), while the *in vitro* values are represented by black triangles (▲). The experimental growth rate values are the average of two replicates for each condition with the standard deviations shown as error bars.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.