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 SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

ÉPREUVE E3 – UNITÉ U32
MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2019

_____

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

_____

Matériel autorisé :

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

Compétences évaluées :

C2.1. Analyser une problématique	9 points
C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents	11 points
C2.4-1. Présenter des informations	5 points
C2.4-2 Analyser, interpréter, valider des résultats	4 points
C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés	9 points

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux ...) seront évalués à hauteur de 2 points sur 40.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Le sujet se compose de 14 pages numérotées de 1/14 à 14/14.

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

OPTIMISATION DE POINTS CRITIQUES DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE

Les produits laitiers sont consommés par une part importante de la population mondiale. Produits alimentaires très complets, ils abritent de nombreux micro-organismes qui peuvent poser de sérieux problèmes sanitaires comme en témoignent les retraits récurrents de produits du marché (laits infantiles, fromages…).

La sécurité alimentaire ne repose pas uniquement sur le contrôle du produit fini mais aussi sur la mise en œuvre de « bonnes pratiques » dans les procédés de fabrication. Pour cela, une entreprise de fromage au lait cru cherche à identifier des points critiques dans son process : ce sont des étapes qui vont permettre des ajustements.

Quelques points critiques potentiels lors de la collecte et de la transformation du lait sont identifiés :

- Suivi et inhibition de la formation d'un biofilm bactérien sur les mamelles bovines.
- Condition de stockage et de caillage du lait.
- Recherche de *listeria monocytogenes* dans le produit fini.

1 Suivi de la formation de biofilms chez le producteur de lait

Le **document 1** présente les étapes de la formation d'un biofilm.

Q1. Proposer une définition d'un biofilm et légender les actions (1) à (5).

Q2. Identifier la nature biochimique et le rôle des deux structures bactériennes qui contribuent à former des biofilms bactériens. Déduire deux stratégies de lutte contre les biofilms.

1.1 Stratégie d'inhibition des Staphylococcus aureus impliqués dans les biofilms

On peut observer des biofilms au niveau des mamelles bovines. *Staphylococcus aureus* entéropathogène est l'un des micro-organismes possiblement présents et problématiques pour l'industrie laitière. Les souches de *S. aureus* retrouvées correspondent souvent à un biotype humain.

Une étude de 2016 propose l'application directe d'huiles essentielles dérivées d'agrumes sur les zones lésées pour agir sur cette espèce. Elle se base sur les résultats de tests *in vitro* dont la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI (**document 2**).

Q3. Expliquer l'origine possible de *S. aureus* dans ces biofilms.

Q4. Proposer une stratégie classique de traitement des mammites infectieuses, et expliquer en quoi la substitution par l'application directe d'huile essentielle présente un intérêt.

Pour la détermination de la CMI, une cupule témoin positif est réalisée.

Q5. Expliquer la composition qualitative de la cupule témoin positif puis expliquer la détermination de la CMI après incubation.

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

1.2 Caractérisation des souches d'Escherichia coli impliqués dans les biofilms

Des cas récurrents de mammites à *Escherichia coli* ont été reportés dans des fermes canadiennes et ont donné lieu à une étude épidémiologique. L'hypothèse formulée est que la présence de biofilms permet la persistance de souches d'*E. coli* pathogènes et l'augmentation des récidives de mammites.

Les employés de ces fermes ont été formés pour réaliser des prélèvements, à l'aide d'écouvillon, de sécrétions anormales présentes au niveau des quatre parties (quartiers) de la mamelle. Des empreintes génétiques des *E. coli* isolés ont ensuite été réalisées afin de définir les génotypes de ces souches. Les résultats du génotypage des *E. coli* au cours des mammites sont donnés pour 18 vaches sur le **document 3**. Le travail sur les mammites a nécessité le recours à des souches de référence conservées à l'aide du coffret « Microbank ™ Dry » de ProLab (**document 4)** en utilisant les équipements de sécurité préconisés (**document 5)**.

Q6. Proposer une précaution à prendre lors des prélèvements et une conséquence possible si cette précaution n'est pas respectée.

Q7. Analyser l'électrophorégramme de la vache A et déterminer :

- Le nombre de cas de mammite différentes caractérisées par leur génotype.
- Le nombre total de récidives présentes.
- Le nombre de cas de mammite dont le génotype **et** le quartier sont identiques.

Etablir un lien entre les récidives observées pour l'ensemble des vaches et l'existence de biofilms.

Q8. Présenter sous forme d'organigramme, le mode opératoire pour la préparation des tubes et la congélation des souches de référence. Expliquer le mode d'action des agents cryoprotecteurs et en donner un exemple.

Q9. Identifier sur la coupe de Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) à quoi correspondent :

- Les flèches en traits pleins.
- Les flèches en pointillés.
- Les zones hachurées.

Déduire les trois avantages de l'utilisation de cet équipement.

2 Suivi de la transformation du lait en fromage

2.1 Température de stockage du lait

Le stockage du lait, entre la traite et la transformation, se fait dans le but de préserver les qualités microbiologique, nutritionnelle et organoleptique du lait. Il se fait habituellement à 4°C. Dans le but de faire des économies d'énergie, l'industriel voudrait augmenter la température de stockage à 8°C.

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

Le **document 6** présente les résultats d'une étude de 2001 comportant :

- Une comparaison de la lipolyse, de la protéolyse et des propriétés sensorielles lors du stockage du lait après la traite, ce à 4 °C ou 8 °C pendant les 48 h suivant la traite.
- Un dénombrement la flore mésophile aérobie totale à 30 °C.
- Un dénombrement la flore psychrotrophe à 8 °C.

Un décret de 2004 présente la population microbienne tolérable sur un lait cru. Un extrait est fourni dans le **document 7**.

Q10. Expliquer la distinction faite entre germes psychrophile et psychrotrophe. Analyser les résultats du suivi de 2001. Conclure sur la possibilité de stocker le lait après la traite à 8°C en précisant la durée maximale de conservation à cette température.

2.2 Recherche de bactériophages susceptibles d'altérer les ferments lactiques dans les eaux de rinçage

Lactococcus lactis et *Lactococcus thermophilus* sont parmi les espèces bactériennes les plus utilisées dans l'industrie fromagère. Cependant ces bactéries sont très vulnérables à l'attaque de phages virulents.

Ceux-ci peuvent provenir de la matière première : le lait cru est en effet un réservoir de bactéries lactiques mais également un réservoir de leurs phages.

L'eau utilisée dans la fromagerie ou dans la ferme pour rincer les équipements peut aussi être le vecteur de phages. L'entreprise a réalisé une étude préliminaire sur l'effet du traitement aux UV de l'eau utilisée pour diminuer la charge phagique. Elle utilise le couple *L. thermophilus* et le phage 2972. Les phages spécifiques de *L. thermophilus* ont tous une structure proche et sont lytiques (**document 8**). Pour doser les phages restants après traitement de l'eau, on peut utiliser la méthode de la double couche (**document 9**). Le rapport [nombre de virions / nombre de bactéries] est appelé *multiplicity of infection* ou MOI.

Q11. Expliquer pourquoi une MOI faible est nécessaire à la mise en œuvre d'un dénombrement de phages.

Q12. Analyser le protocole de titration phagique en donnant le rôle des éléments soulignés. Construire un tableau de dilution des phages d'une eau non encore traitée (titre attendu pour les eaux de rinçage d'environ 10^6 UFP.mL^{-1}).

Q13. Proposer un mode opératoire pour réaliser deux boîtes témoin et préciser le résultat attendu.

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

2.3 Suivi de la présence de *Listeria monocytogenes* dans le produit fini

Ce micro-organisme omniprésent dans l'environnement affecte un groupe restreint de personnes : les YOPIs (*young old pregnant immunodeficients*). La maladie provoquée appelée listériose peut être fatale dans 30 % des cas. Ce micro-organisme est souvent présent à cause de contaminations par manque d'hygiène lors de la fabrication du fromage. Dans le cadre d'une démarche qualité, l'entreprise réalise des autocontrôles et recherche notamment la présence de *Listeria* dans le fromage au lait cru.

Le **document 10** donne le plan de recherche de référence de ce micro-organisme qui passe par l'utilisation notamment de la gélose Oxford (**document 11**). À côté de ce plan de référence on peut utiliser des méthodes alternatives dans un premier temps et confirmer l'identité des colonies suspectes par la méthode de référence.

Q14. Donner le rôle des constituants apparaissant en gras dans la composition de la gélose Oxford et justifier l'aspect d'une colonie caractéristique de *L. monocytogenes*.

Q15. Expliquer l'intérêt de l'utilisation des méthodes alternatives fondées sur la PCR ou sur la spectrométrie de masse.

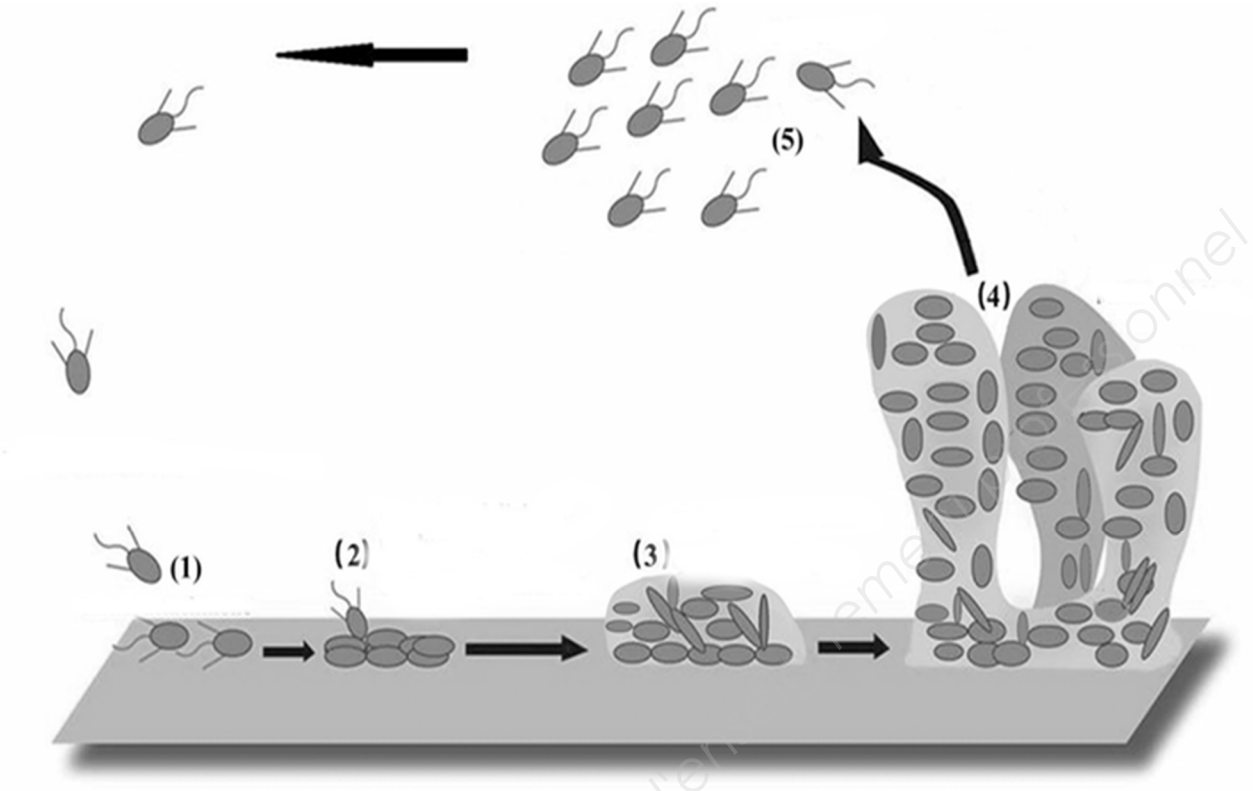
Bilan

Le logigramme de l'OMS (**document 12**) permet de déterminer si une étape constitue un point critique. L'entreprise a utilisé cette démarche pour mettre en évidence les différents points critiques de son process, dont les exemples développés précédemment.

Q16. Justifier que l'étape de stockage du lait, avant transformation, constitue un point critique.

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

Document 1 : étapes de la formation d'un biofilm bactérien.



Source : http://amgar.blog.processalimentaire.com/wp-content/uploads/2015/06/biofilm.png

Document 2: procédure de détermination de la concentration minimale inhibitrice (*MIC*) d'une huile essentielle d'agrume (*citrus derived oil*) sur une souche de *Staphylococcus aureus*.

Bacterial strain and growth conditions

Staphylococcus aureus ATCC 29740 was used in this study. This strain has been isolated from bovine mastitic milk. Bacteria were maintained in nutrient broth or nutrient agar and were grown for 18 to 24h before use.

Preparation of citrus-derived essential oil (CDO)

Terpeneless, cold-pressed Valencia orange oil was provided by Firmenich Citrus Center. A stock solution was prepared by dissolving CDO in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, St Louis, MO) to a final concentration of 40% CDO.

Determination of MIC

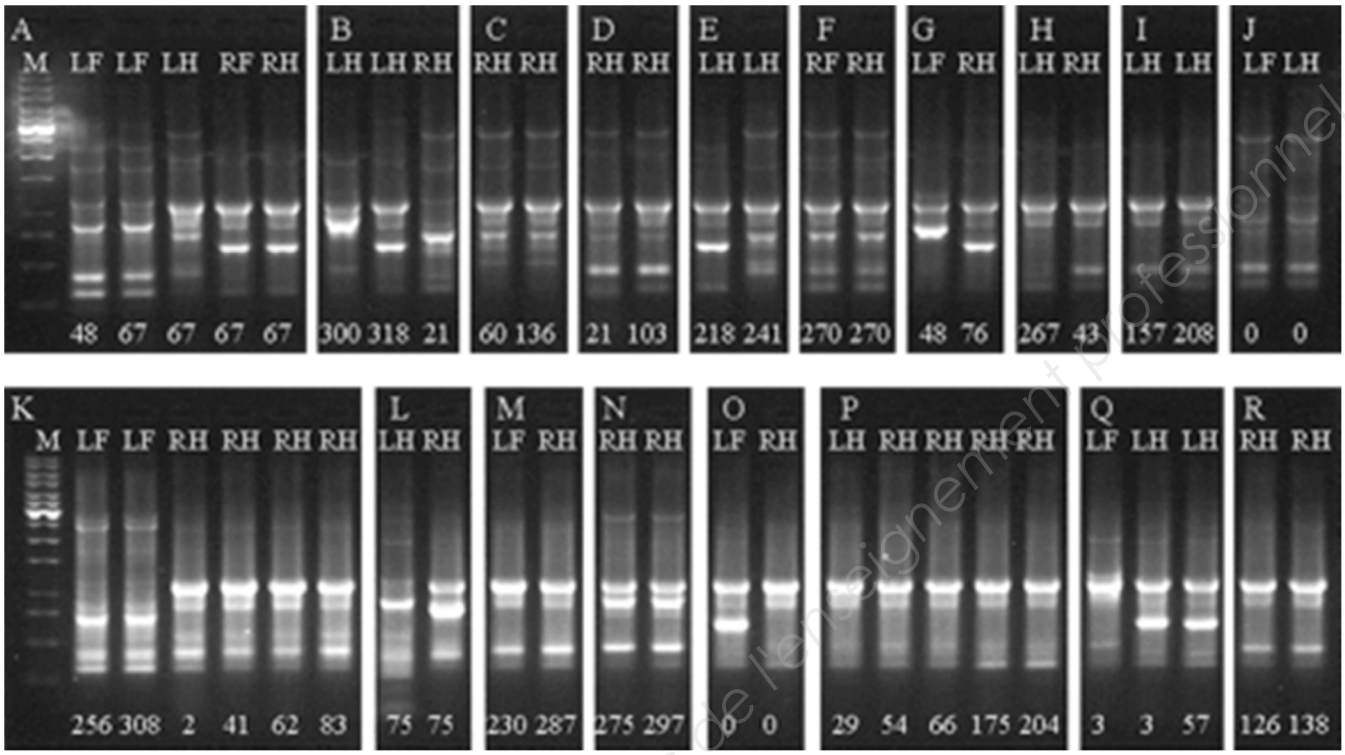
Using a spectrophotometer, *S. aureus* was diluted to 10^5 CFU/mL in nutrient broth (Difco, Becton, Dickinson and company, Franklin lanes, NJ) by adjusting it to an attenuation at 600 nm of 0.08 to 0.12 (10^8 CFU/mL). This was further diluted to 10^5 CFU/mL.

The broth dilution method was used to determine the MIC of *S. aureus*. Concentrations of CDO ranging from 0.0125% to 0.4% CDO with half-step dilutions were added to 24 well plates containing 10^5 CFU/mL/well of *S. aureus*. Plates were incubated overnight.

Source : C. Federman et al; « Citrus-derived oil inhibits S. aureus growth and alters its interactions with bovine mammary cells. », J.Dairy Sci, 2016, 99: 3667-3674.

Document 3 : empreintes ADN d'isolats d' *E coli* de vaches.

(De: A.J. Bradley, M.J Green; "Adaptation of *E coli* to the bovine mammary gland", Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(5): 1845-1849).



Légende :

- A à R : vaches ayant présenté des mammites récurrentes.
- Lignes M : marqueur de poids moléculaire 1kb de Promega.
- Nombre en bas de ligne : jour de la lactation où l'inflammation a été constatée.
- Quartiers de la mamelle : LF avant gauche ; LH arrière gauche ; RF avant droit ; RH arrière droit.

Donnée :

On comptabilise une récidive :

- *Présence d'E.coli à un intervalle de 5 jours ou plus, sur le même quartier.*
- *Présence d'E.coli au niveau de deux quartiers au même moment.*

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

Document 4 : extrait de la fiche technique du kit « Microbank™ Dry » de Promega.

PROCEDURE

A. PREPARATION

1. Cryopreservative is prepared based on the customer's formulation and sterilized.
2. Using asceptic technique, add cryopreservative to the required number of Microbank™-Dry vials:
   a. Unscrew the Microbank™-Dry vial cap.
   b. Using a sterile pipette transfer 1mL of cryopreservative into the Microbank™-Dry vial.
   c. Replace the cap on the Microbank™-Dry vial tightly.

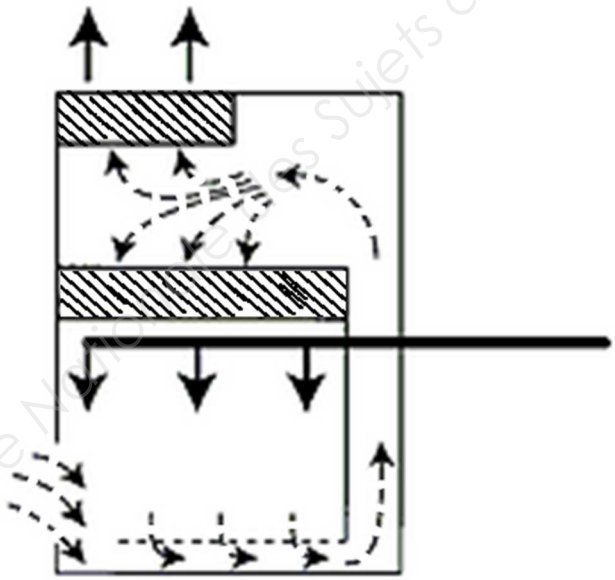
B. INOCULATION OF MICROBANK™

1. Using a permanent marker, label a separate Microbank™ vial for each organism to be stored.
2. Using aseptic technique, unscrew the Microbank™ vial cap.
3. Using a sterile inoculating loop or cotton swab, pick off enough colonies from a pure culture to achieve a 3-4 McFarland standard in the cryopreservative. In general, an overnight culture (18-24 hours) of the isolate is preferred.
4. Using aseptic technique, replace the cap on the Microbank™ vial tightly and invert it 4-5 times to emulsify the organism. DO NOT VORTEX!
5. Let the Microbank™ vial sit for 2 minutes to allow the isolate to bind to the beads. Remove the cap and use a sterile disposable pasteur pipette to remove the cryopreservative. The beads should be as free of liquid as possible.
6. Close the Microbank™ vial finger tight only. It is important that the Microbank™ vials are not overtightened.
7. Place the Microbank™ vial in a Microbank™ Freezer Storage Box and freeze at -70°C.

C. RECOVERY OF THE BACTERIAL AND FUNGUS ISOLATES

1. Remove the Microbank™ vial from the -70°C freezer and place it in a cold cryoblock (PL.155-1).
2. Using aseptic technique, open the Microbank™ vial and using a sterile needle or forceps remove one coloured bead. Close the Microbank™ vial finger tight and return as soon as possible to the freezer. Excessive changes in temperature will reduce the viability of the frozen isolates.
3. The bead may then be streaked directly onto a solid medium or may be inoculated into an appropriate liquid medium.

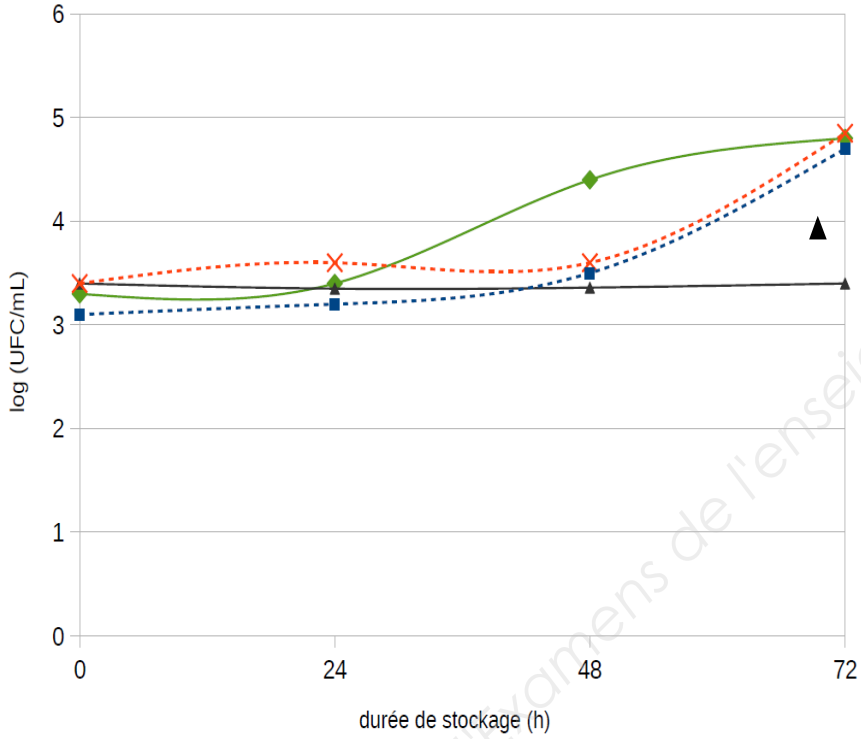
Document 5 : coupe verticale du PSM de type II.



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

- **Document 6 : résultats de l'étude sur l'effet de la température de stockage du lait cru.**
- **Suivi de la flore mésophile aérobie totale et des bactéries psychrotrophes dans le lait cru, en fonction de la température de stockage.**

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et des bactéries psychrotrophes sont réalisés sur gélose PCA (*Plate Count Agar*). Les temps d'incubation sont de 3 jours à 30 °C pour la flore totale et 10 jours à 8 °C pour les psychrotrophes.



Légende

- Courbes en traits pleins : microorganismes stockés à 4 °C (losanges : psychrotrophes, triangles: flore totale).
- Courbes en pointillés : microorganismes stockés à 8 °C (croix : flore totale, carrés: psychrotrophes).

Comparaison de la lipolyse, protéolyse et propriétés sensorielles en fonction de la température de stockage.

La plupart des modifications enzymatiques apparaissent à partir d'un jour de stockage réfrigéré (à 4 °C) du lait cru. Entre les jours 1 et 3, on n'observe pas d'augmentation ultérieure de la protéolyse et de la lipolyse. Ceci concorde avec les données sensorielles, étant donné que des modifications apparaissent dès le jour 1 et qu'il n'y en a pas d'autres entre les jours 1 et 3 quelle que soit la température de stockage.

Le stockage du lait cru à 8 °C provoque un ralentissement de la lipolyse et de la protéolyse en comparaison avec ce qu'on observe à 4 °C.

*Source : A.O'Connell, †P.L.Ruegg,†K.Jordan,‡B.O'Brien, *D.Gleeson* "The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk"J Dairy Sci. 2001 May;99(5):3367-3374.*

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

Document 7 : extrait du règlement CE n°853/2004 du 29 avril 2004.

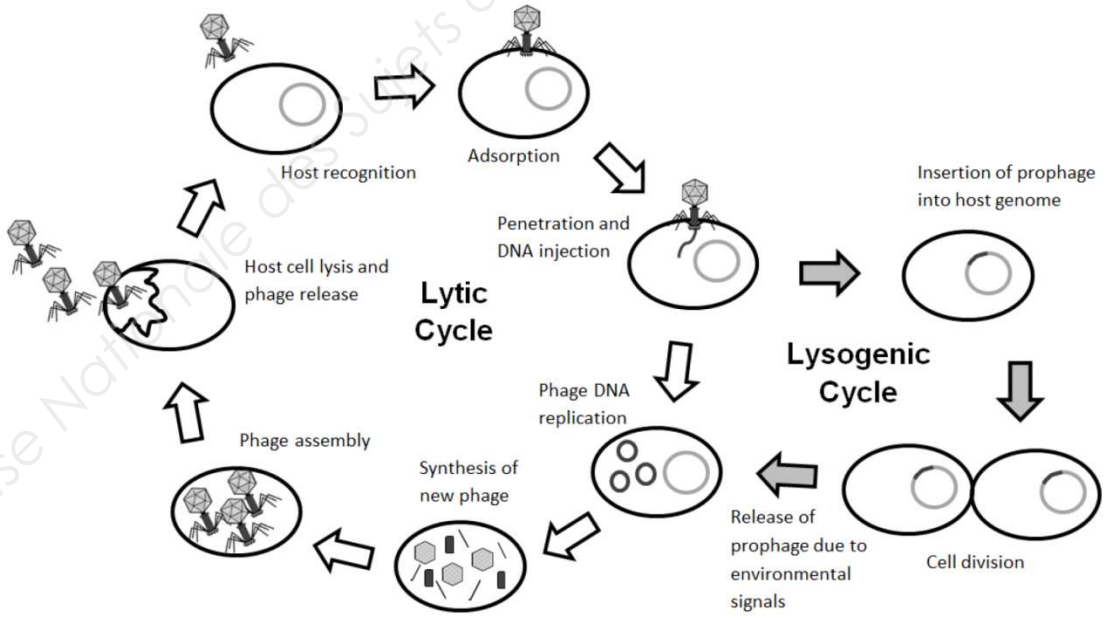
Laits collectés et/ou destinés à la transformation.

PRODUIT	CRITERES D'HYGIENE DES PROCEDES
Lait cru de vaches collecté	Germes à 30 °C ≤ 100 000 / mL (1)
	Cellules somatiques ≤ 400 000 (2)
Lait cru d'autres espèces que les vaches	Germes à 30 °C ≤ 1 500 000 / mL (3)
Lait cru de vaches avant transformation	Germes à 30 °C < 300 000 / mL
Lait ayant fait l'objet d'un traitement thermique pour fabrication de produits laitiers	Germes à 30 °C < 100 000 / mL
Lait d'autres espèces que les vaches, pour fabrication de produits au lait cru sans traitement thermique	Germes à 30 °C ≤ 500 000 / mL

(1) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.
(2) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de trois mois, avec au moins un prélèvement par mois.
(3) Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.

Source : (Règlement (CE) n°853/2004 du 29 avril 2004 - Annexe III - Section IX lait cru et produit laitiers – III Critères applicables au lait cru).

Document 8 : cycles de reproduction des phages.



Source : https://res.mdpi.com/viruses/viruses-09-00050/article_deploy/html/images/viruses-09-00050-g002.png

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

Document 9 : dosage des phages par méthode en double couche.

Matériel, réactifs, souches

– Souche *L. thermophilus* sensible au phage en bouillon LB. Culture de la nuit.

– Suspension de phages de référence ou bioproduit à analyser.

– Flacon de 30 mL de NaCl 9 g/L stérile.

– 6 boîtes de Petri de milieu nutritif gélosé LB.

– Tubes à essai stériles.

– Top LB agar : milieu LB à 6 g/L d'agar, maintenu en surfusion à 46 °C.

➔ Réaliser des dilutions en série géométrique de raison 1/10 de la suspension de phages à titrer.

➔ Tester 3 dilutions successives choisies selon l'échantillon.

Procédure opératoire

Dans une série de 3 tubes stériles préchauffés à 37 °C, mélanger 100 µL de dilution de chacune des suspensions phagiques à tester et 100 µL de culture de bactérie. Transférer immédiatement 4 minutes à 37 °C (séjour à l'étuve).

Revenir à la paillasse rapidement et ajouter alors très doucement 3 mL de milieu gélosé en surfusion «gélose demi-molle» (top LB agar). Homogénéiser très doucement et, avant refroidissement, verser et répartir à la surface d'une boîte de Petri préchauffée quelques minutes à 37 °C contenant du milieu nutritif agarosé. Incuber boîtes retournées.

Compter les plages de lyse des boîtes exploitables. Une boîte lisible de dénombrement présente 100 plages de lyse.

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

Document 10 : plan de recherche de *listeria monocytogenes* dans un produit alimentaire.

Prise d'essai (25 g) dans 225 mL de bouillon de Frazer-demi

↓ 30 °C, 24-48 h *

Isolement sur milieu sélectif d'orientation (ex : gélose Oxford)

↓ 35–37 °C, 24-48 h

Repérage des colonies suspectes

Identification de *L. monocytogenes* sur 5 colonies suspectes :

Gram : bacilles Gram + réguliers

État frais : mobile à 25 °C, tourbillons

Catalase +

Identification de l'espèce par ensemencement d'une galerie miniaturisée (ex : API Listeria)

↓ 35-37 °C, 24-48 h

Lecture et conclusion

* Après la première incubation on peut extraire l'ADN et réaliser une PCR. On ne poursuit l'identification que si le résultat de PCR est positif.

D'après ISO NF EN 11290-1 février 1997, amendée février 2005.

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

Document 11 : gélose oxford (d'après biokar diagnostics).

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose Oxford est un milieu sélectif utilisé pour la différenciation, l'isolement et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les fromages, ainsi que dans les autres produits alimentaires, même fortement contaminés.

FORMULE - TYPE du milieu complet

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

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone ……..20,0 g
- Extrait autolytique de levure……..... 3,0 g
- Amidon……..... 1,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Esculine ..... 1,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal ..... 0,5 g
- Chlorure de lithium.....15,0 g
- Cycloheximide.....…400,0 mg
- Colistine (sulfate) ..... ….20,0 mg
- Céfotétan ..... 2,0 mg
- Fosfomycine..... 10,0 mg
- Acriflavine ..... 5,0 mg
- Agar agar bactériologique.....13,0 g

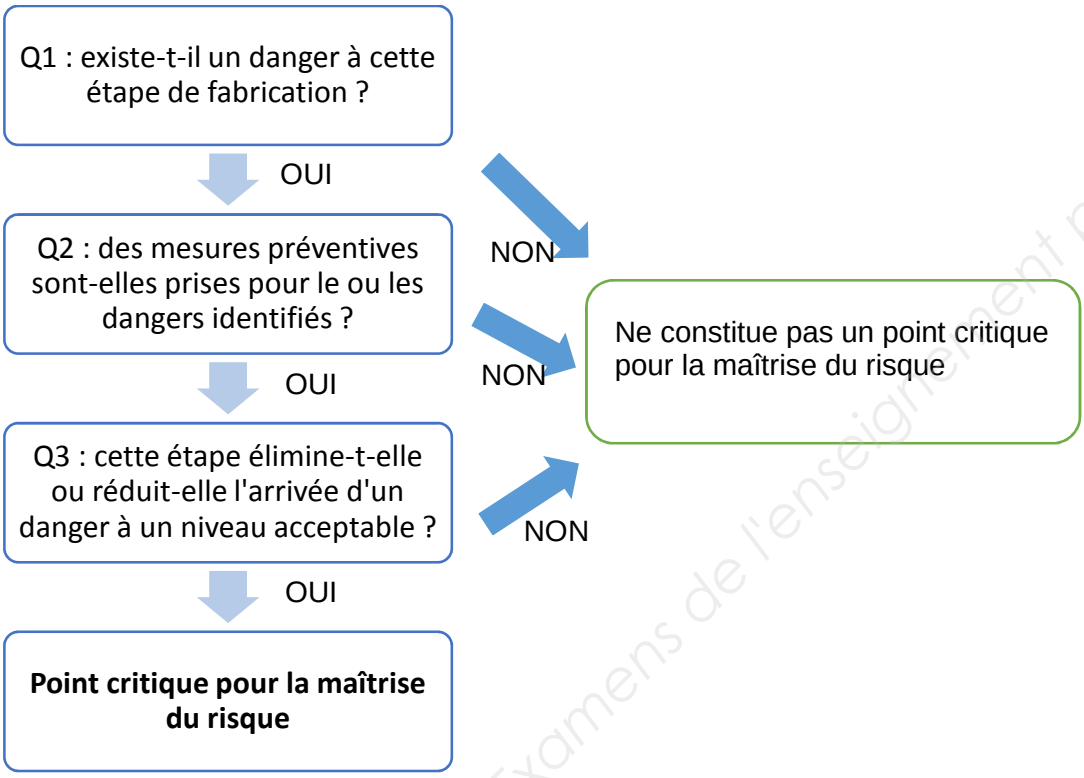
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

LECTURE

Après 24 heures d'incubation, *Listeria monocytogenes* forme des colonies vert-olive entourées d'un halo noir. Après 48 heures, elles deviennent plus foncées avec un centre noir et sont entourées de zones noires.

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

Document 12 : arbre de décision pour la détermination des points critiques (d'après un document de l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS).



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.