ÉPREUVE E3. UNITÉ U32
Microbiologie et technologies d'analyse

LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Calculatrice non autorisée

Les biocontaminations sont la préoccupation majeure des industries agroalimentaires.

L'hygiène des aliments est préservée par des démarches préventives ainsi que par la mise en œuvre de procédés de conservation.

1 - Hygiène des aliments (12 points)

1.1 - Les aliments peuvent être contaminés par une flore exogène comportant des microorganismes divers.

1.1.1 - Quelles sont les origines possibles de ces contaminants exogènes contribuant à une mauvaise hygiène des aliments ?

1.1.2 - Citer deux bactéries ou flores bactériennes dénombrées lors de contrôles d'hygiène des procédés. Précisez pour chacune d'elles la signification de leur présence anormalement élevée.

1.2 - En dessous de 10°C, en atmosphère humide, la surface des pièces de viande est en quelques jours envahie par des bacilles psychrotrophes Gram négatif qui forment un biofilm appelé limon. Ces microorganismes produisent des enzymes capables de dégrader les protéines et les acides aminés.

1.2.1 - Définir une bactérie psychrotrophe.

1.2.2 - Qu'est-ce qu'un biofilm ? Expliquer brièvement les différentes étapes de sa formation et préciser la nature du composant bactérien qui le constitue.

1.2.3 - Quelles peuvent être les conséquences de la formation de biofilms dans l'industrie agroalimentaire ?

1.2.4 - La dégradation des acides aminés aboutit à la libération d'amines biogènes toxiques pour l'organisme.

1.2.4.1 - Quelle catégorie d'enzyme est responsable de la formation d'amines ?
Écrire la réaction chimique générale qu'elle catalyse.

1.2.4.2 - Certaines de ces enzymes sont recherchées pour l'identification des bacilles Gram négatif.
Citer deux de ces enzymes et le nom d'un milieu d'identification dans lequel elles sont recherchées.
Exposer le principe de leur mise en évidence en vous basant sur la composition du milieu.

2 - Prévention des contaminations (18 points)

Dans les industries agroalimentaires, les surfaces des équipements ne doivent pas constituer une source de contamination pour les aliments qui entrent en contact avec elles.

Il est indispensable de réaliser des opérations de nettoyage et désinfection efficaces après chaque production.

2.1 - Définir les termes « nettoyage » et « désinfection ».

2.2 - Comme les antiseptiques et les antibiotiques, les désinfectants ont une activité antimicrobienne.

2.2.1 - Comparer ces trois familles de molécules à activité antimicrobienne.

2.2.2 - Exposer les mécanismes d'action qui expliquent l'activité antibactérienne des désinfectants. Illustrer à l'aide d'exemples précis.

2.2.3 - Quels sont les paramètres conditionnant l'efficacité d'un protocole de désinfection ?

2.3 - Le seuil d'efficacité d'un désinfectant est évalué par sa CMB.
Une laiterie veut déterminer la CMB d'un produit désinfectant pour sols et surfaces sur une souche bactérienne isolée de manière répétitive lors des contrôles de surfaces. Cette détermination est réalisée en 2 temps :
- détermination des concentrations inhibitrices ;
- détermination de la CMB.

2.3.1 - La détermination des concentrations inhibitrices est réalisée par la technique en microplaque en bouillon Mueller-Hinton, **document 1** :

2.3.1.1 - Élaborer un tableau décrivant le travail réalisé. Dans ce tableau, indiquer les résultats obtenus dans le cas d'une CMI correspondant à une dilution finale au 1/128. Justifier.

2.3.1.2 - Sachant que la concentration en substance active est de 4 g/L, calculer la valeur de la CMI. Justifier.

2.3.2 - La CMB est déterminée par transfert puis étalement sur gélose du contenu des cupules dans lesquelles on observe l'absence de croissance. Que signifie CMB ?

Dans le cas d'un effet bactéricide, quel est le nombre maximal de colonies attendues sur la gélose ensemencée avec la totalité du contenu de la cupule CMI ?

Donnée : À la CMB 99,999 % des bactéries sont tuées.

3 - Conservation des produits alimentaires (30 points)

3.1 - Différentes stratégies sont utilisées afin de réduire le développement des flores d'altération.

3.1.1 - Toute l'eau présente dans un produit alimentaire est-elle disponible pour les microorganismes ? Justifier.

3.1.2 - Quels paramètres physico-chimiques permettent d'estimer la proportion et la disponibilité en eau d'un produit alimentaire ?

3.1.3 - Citer deux stratégies différentes utilisées dans le but de réduire la disponibilité en eau.

3.2 - Produits par des bactéries lactiques ou des Actinomycètes, les conservateurs d'origine biologique sont de plus en plus employés dans le secteur agroalimentaire afin de stabiliser les aliments.

La nisine est un polypeptide de 34 acides aminés, seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire (E234). C'est un métabolite secondaire synthétisé naturellement par les souches de *L. lactis* spp *lactis*.

3.2.1 - À partir du **document 2**, expliquer le mode d'action de la nisine.
Justifier son action létale sur la bactérie.

3.2.2 - Quel est le spectre d'action de la nisine ?
Justifier la réponse.

3.2.3 - La nisine est utilisée comme additif dans la fabrication des fromages à pâte cuite, elle prévient les gonflements tardifs causés par le développement de la bactérie *Clostridium tyrobutyricum*.

3.2.3.1 - Préciser les principaux caractères morphologiques et culturaux des bactéries appartenant au genre *Clostridium*.

3.2.3.2 - Proposer une hypothèse expliquant la cause des gonflements tardifs engendrés par le développement de cette bactérie à l'intérieur d'une meule de fromage.

3.2.4 - L'activité de la nisine a été testée en présence d'autres molécules.
Analyser les courbes du **document 3**. En déduire l'association la plus intéressante.

3.3 - La natamycine ou pimaricine est un antifongique appartenant au groupe des macrolides tétraènes : elle est produite par la bactérie *Streptomyces natalensis* et est employée comme conservateur dans le traitement de surfaces de certains fromages et de produits de charcuterie.

3.3.1 - Quelle autre famille de composés à activité biologique est principalement produite par des bactéries du genre *Streptomyces* ?

3.3.2 - En vous aidant du **document 4** :

3.3.2.1 - Décrire l'aspect macroscopique et microscopique à la coloration de Gram des bactéries du genre *Streptomyces*.

3.3.2.2 - Préciser l'habitat naturel de ces bactéries.

3.3.2.3 - Indiquer les caractères culturaux de ces bactéries.

3.3.2.4 - Quel est le rôle de chacun des constituants du milieu de culture proposé.

3.3.3 - Des études récentes ont montré l'action de la natamycine au niveau de l'inhibition de la synthèse des stérols. Proposer une explication quant à son absence d'efficacité sur les procaryotes.

3.4 - Un exemple de flore d'altération : les mycètes.

3.4.1 - L'identification des mycètes repose essentiellement sur leur description morphologique.

Légender les figures du document 5 (de « a » à « n ») et proposer un nom de genre pour les microorganismes A, B, C.

3.4.2 - Certaines moisissures sont écartées à cause des mycotoxines produites par certaines souches.

3.4.2.1 - Donner deux exemples de mycotoxines et préciser leur origine.

3.4.2.2 - Citer des aliments susceptibles de renfermer des mycotoxines.
Préciser les principaux risques liés à leur ingestion pour la santé humaine.

3.4.3 - Certains champignons filamenteux peuvent être à l'origine d'altération des produits alimentaires. Proposer une explication de ce phénomène.

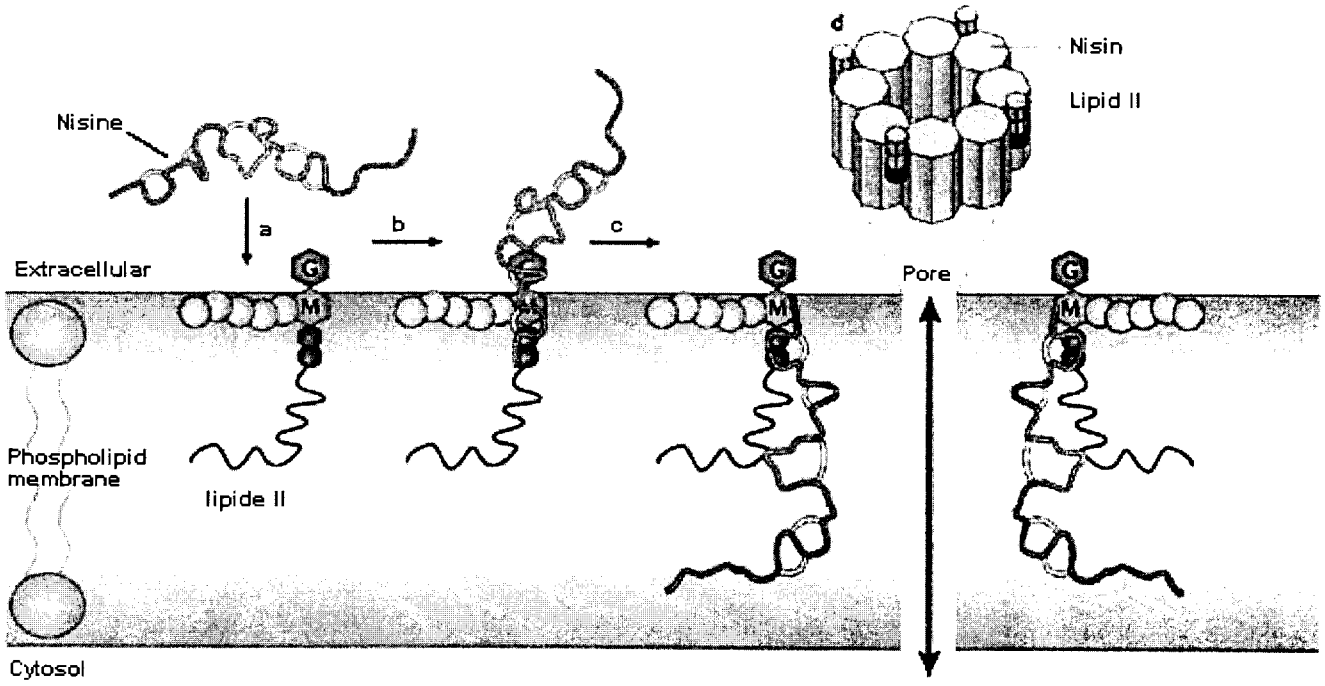
DOCUMENT 1 :

DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS INHIBITRICES : MODE OPÉRATOIRE

- Dilution en série du désinfectant de 1/1 à 1/2048 selon une progression géométrique de raison ½ sous un volume de 50 µL en bouillon Mueller-Hinton.
- Addition dans chaque cupule de 50 µL de suspension bactérienne à 2.10^5 UFC/mL en bouillon Mueller-Hinton double concentration.
- Incubation à 20°C pendant 18 heures.
- Un témoin de croissance est réalisé en même temps.

DOCUMENT 2 :

G : N acetyl glucosamine
M : acide N acetyl muramique



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

First, nisin reaches the bacterial plasma membrane (a), where it binds to Lipid II via two of its amino-terminal rings (b). This is then followed by pore formation (c), which involves a stable transmembrane orientation of nisin. During or after assembly of four 1:1 (nisin: Lipid II) complexes, four additional nisin molecules are recruited to form the pore complex (d).

Source : http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n4/fig_tab/nrd2004_F4.html#figure-title

DOCUMENT 3 :

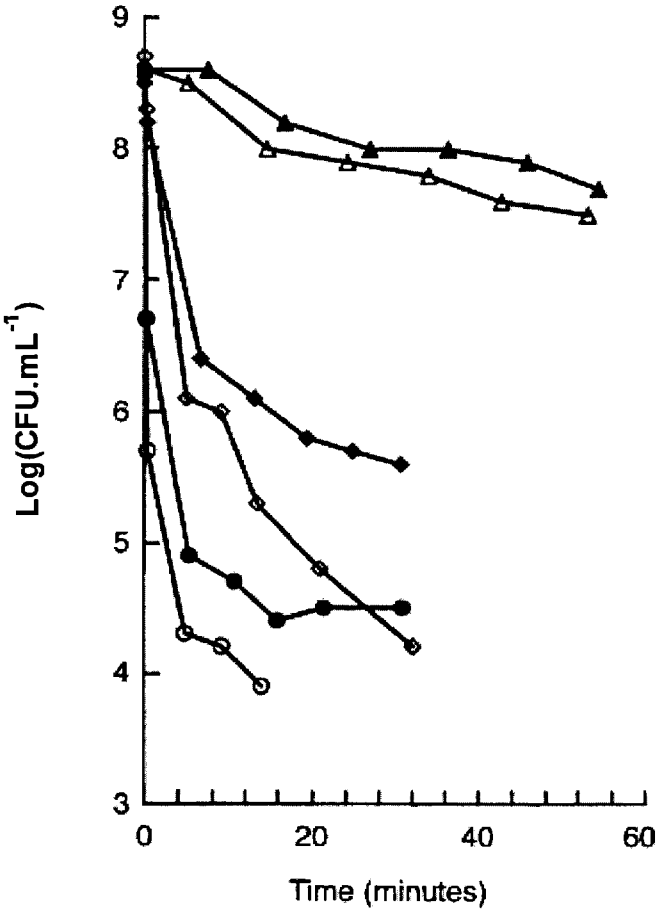


Fig. 3 Effect of lysozyme on the inhibitory effect of nisin and/or carvone on *L. monocytogenes* at 8 °C. Nisin 5·3 μg ml^{-1} (◆), nisin 5·3 μg ml^{-1} + lysozyme 313 units (◇), nisin 5·3 μg ml^{-1} + carvone 10 mmol l^{-1} (●), nisin 5·3 μg ml^{-1} + carvone 10 mmol l^{-1} + lysozyme 313 units (○), lysozyme 313 units (△), carvone 10 mmol l^{-1} + lysozyme 313 units (▲).

Adapté de : http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x

DOCUMENT 4 :

References

1. Pine and Watson. 1959. J. Lab. Clin. Med. 54:107.
2. Aiello, Georg, Kaplan and Kaufman. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Availability

BBL™ Actinomyces Broth

Cat. No. 210920 Dehydrated – 500 g

Actinomycete Isolation Agar Glycerol

Intended Use

Actinomycete Isolation Agar is used with added glycerol for isolating and cultivating actinomycetes from soil and water.

Glycerol is used in preparing microbiological culture media.

Summary and Explanation

Although some genera are important to human medicine, most of the actinomycetes are part of the indigenous flora of soil, water and vegetation. Actinomycetes may impart a musty odor to water or a muddy flavor to fish.[1] Actinomycetes can cause massive growths which will form a thick foam in the activated sludge process, causing a disruption in wastewater treatment.[2,3] Actinomycetes are gram-positive, acid-fast cells, growing as filaments that may branch and may form irregularly shaped rods and cocci.

Olsen[4] formulated Actinomycete Isolation Agar for isolating and cultivating actinomycetes from soil and water. The formula is supplemented with glycerol, a highly purified fermentable alcohol used occasionally for differentiating certain bacteria and in media for isolating and culturing fastidious bacteria.

Principles of the Procedure

Actinomycete Isolation Agar contains sodium caseinate which is a source of nitrogen. Asparagine is an amino acid and a source of organic nitrogen. Sodium propionate is a substrate used in anaerobic fermentation. Dipotassium phosphate provides buffering capability to maintain pH balance. Magnesium sulfate and ferrous sulfate provide sources of sulfates and metallic ions. Agar is the solidifying agent. The added glycerol is a source of carbon.

User Quality Control

Identity Specifications

Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Dehydrated Appearance:	Light beige, free-flowing, homogeneous.
Solution:	2.2% solution, soluble in purified water upon boiling with 0.5% Glycerol. Solution is light to medium amber, opalescent to opaque with precipitation.
Prepared Appearance:	Medium amber, opalescent.
Reaction of 2.2% Solution with 0.5% Glycerol at 25°C:	pH 8.1 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 30 ± 2°C for up to 72 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
Streptomyces achromogenes	12767	10^2-10^3	Good
Streptomyces albus	3004	10^2-10^3	Good
Streptomyces lavendulae	8664	10^2-10^3	Good

Formulae

Difco™ Actinomycete Isolation Agar

Approximate Formula* Per Liter

Sodium Caseinate	2.0	g
Asparagine	0.1	g
Sodium Propionate	4.0	g
Dipotassium Phosphate	0.5	g
Magnesium Sulfate	0.1	g
Ferrous Sulfate	1.0	mg
Agar	15.0	g

Difco™ Glycerol

Glycerin

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 22 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Add 5 g of Glycerol.
4. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
5. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Inoculate medium and incubate at 30°C for up to 72 hours.

Expected Results

Refer to appropriate references and procedures for results.

References

1. Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Lechevalier. 1975. Actinomycetes of sewage-treatment plants. Environ. Protection Technol. Ser., EPA-600/2-75-031, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
3. Lechevalier and Lechevalier. 1974. Int. J. Syst. Bacteriol. 24:278.
4. Olsen. 1960. Personal communication.

Availability

Difco™ Actinomycete Isolation Agar

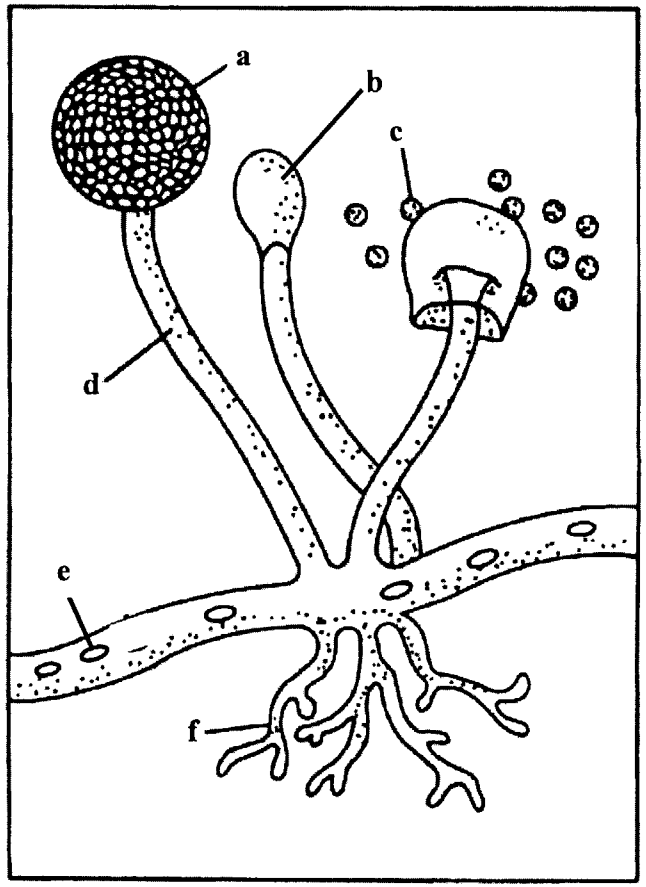
Cat. No. 212168 Dehydrated – 500 g

Difco™ Glycerol

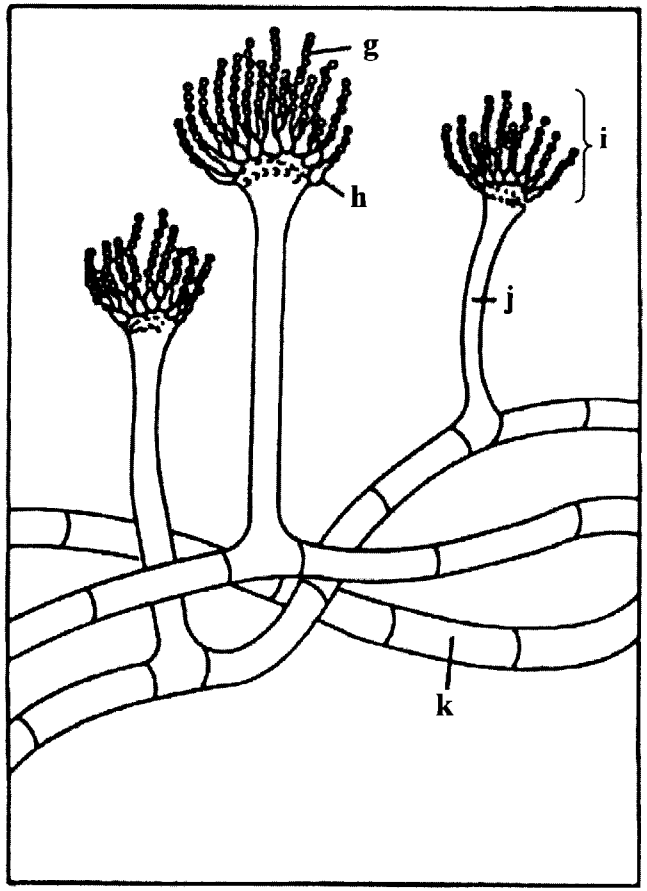
Cat. No. 228210 Bottle – 100 g
228220 Bottle – 500 g

Source : Extrait du catalogue BBL

DOCUMENT 5 :



A



B

C