

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2016

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **8** pages.

CHOIX D'UNE METHODE DE RECHERCHE DE *SALMONELLA* DANS UNE ENTREPRISE AGRO-ALIMENTAIRE

Une entreprise est spécialisée dans l'élaboration de produits dérivés de viande hachée crue.

Dans le laboratoire de contrôle qualité de cette entreprise, des analyses sont réalisées conformément aux règlements et aux critères européens de sécurité microbiologique dans le cadre de la recherche des *Salmonella*. En effet, ce genre bactérien peut être responsable de gastro-entérites sévères.

Afin d'améliorer la spécificité et la rapidité de la recherche, le laboratoire désire comparer deux méthodes de recherche et d'identification des *Salmonella* dans des barquettes de viande hachée crue :

- une méthode normalisée conformément à la norme EN/ISO 6579 ;
- une méthode par immuno-séparation et amplification génique.

1. ETUDE DE LA METHODE NORMALISEE EN/ISO 6579 POUR LA RECHERCHE DE *SALMONELLA*

Cette méthode permet de rechercher et d'identifier les bactéries du genre *Salmonella* éventuellement présentes dans la viande hachée crue préalablement broyée et mise en suspension. Elle est schématisée dans le **document 1**.

- Q1.** Estimer le nombre de jours nécessaires pour que l'analyse soit réalisée dans son ensemble.
- Q2.** A l'aide du **document 1**, replacer les cinq étapes de la liste ci-dessous dans l'ordre chronologique.
Liste : *enrichissement, identification, isolement, pré-enrichissement, sérotypage*.

L'étape 3 du **document 1** permet de repérer les colonies suspectes. Le milieu sélectif choisi pour cette étude est la gélose *Salmonella-Shigella* (SS) dont la fiche technique est présentée dans le **document 2**. L'identification repose sur des caractères biochimiques dont les principaux figurent dans le **document 3**.

- Q3.** Décrire l'aspect des colonies suspectes. Argumenter la réponse.
- Q4.** Retrouver dans le tableau d'identification une autre espèce qui donnerait le même type de colonies.
- Q5.** Montrer alors l'intérêt de la recherche du caractère « uréase ».

La recherche de l'uréase est effectuée dans le milieu urée-tryptophane. Cette technique est présentée dans le **document 4**.

- Q6.** Repérer l'indicateur coloré de pH du milieu urée-tryptophane.
Expliquer sa couleur dans le cas d'une souche « uréase + ».
- Q7.** Déduire l'aspect d'un tube urée-tryptophane ensemencé avec *Salmonella enterica*, après incubation 24 h à 37 °C.

Le **document 5** présente l'analyse microbiologique de quelques denrées alimentaires.

Cinq barquettes de viande hachée crue sont extraites de façon aléatoire de la chaîne de fabrication. Elles constituent les cinq unités représentatives du lot de production n°06/2015 dans lequel on procède à la recherche de *Salmonella*.

Un prélèvement de 25 grammes est effectué dans chacune des cinq barquettes.

Les résultats obtenus sur les cinq unités de viande hachée crue sont les suivants :

- 4 unités n'ont pas révélé la présence de *Salmonella* ;
- 1 unité a révélé la présence de *Salmonella*.

Q8. Analyser les résultats obtenus pour chaque unité du lot de production n°06/2015 et conclure quant à la qualité de ce lot.

Q9. Après avoir rappelé le risque lié à la présence de *Salmonella* dans la viande hachée pour le consommateur, en déduire la décision à prendre par l'entreprise vis-à-vis de la commercialisation du lot testé.

2. ETUDE D'UNE METHODE DE DETECTION DE SALMONELLA PAR IMMUNO-SEPARATION ET AMPLIFICATION GENIQUE

Afin d'optimiser la recherche de *Salmonella* dans la viande hachée crue, le laboratoire de contrôle qualité teste une méthode comportant une technique d'immuno-séparation magnétique présentée dans le **document 6**.

Les *Salmonella* sont mises en contact avec des billes magnétiques porteuses d'anticorps. Un aimant permet ensuite de récolter les billes magnétiques.

La présence de *Salmonella* fixées sur les billes est révélée par une technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) après extraction de l'ADN. Le mélange réactionnel pour la PCR permet l'amplification d'un fragment d'ADN de 247 paires de bases.

Q10. Montrer, à l'aide du **document 6**, que l'immuno-séparation d'une part, et l'amplification génique d'autre part, sont spécifiques de *Salmonella*.

La PCR est suivie d'une électrophorèse d'ADN en gel d'agarose en présence d'un agent révélateur de l'ADN à pH 8.

Au cours de l'électrophorèse présentée dans le **document 6**, l'ADN, déposé dans les puits et soumis à un champ électrique, migre du pôle négatif vers le pôle positif.

Q11. Argumenter le sens de migration de l'ADN.

Q12. En s'appuyant sur le principe de l'électrophorèse en gel d'agarose, expliquer la différence de position des 2 bandes « 100 pb » et « 1500 pb » du marqueur de taille dans la piste 8.

Q13. Les deux témoins sont conformes aux résultats attendus. Argumenter le rôle de chacun de ces témoins.

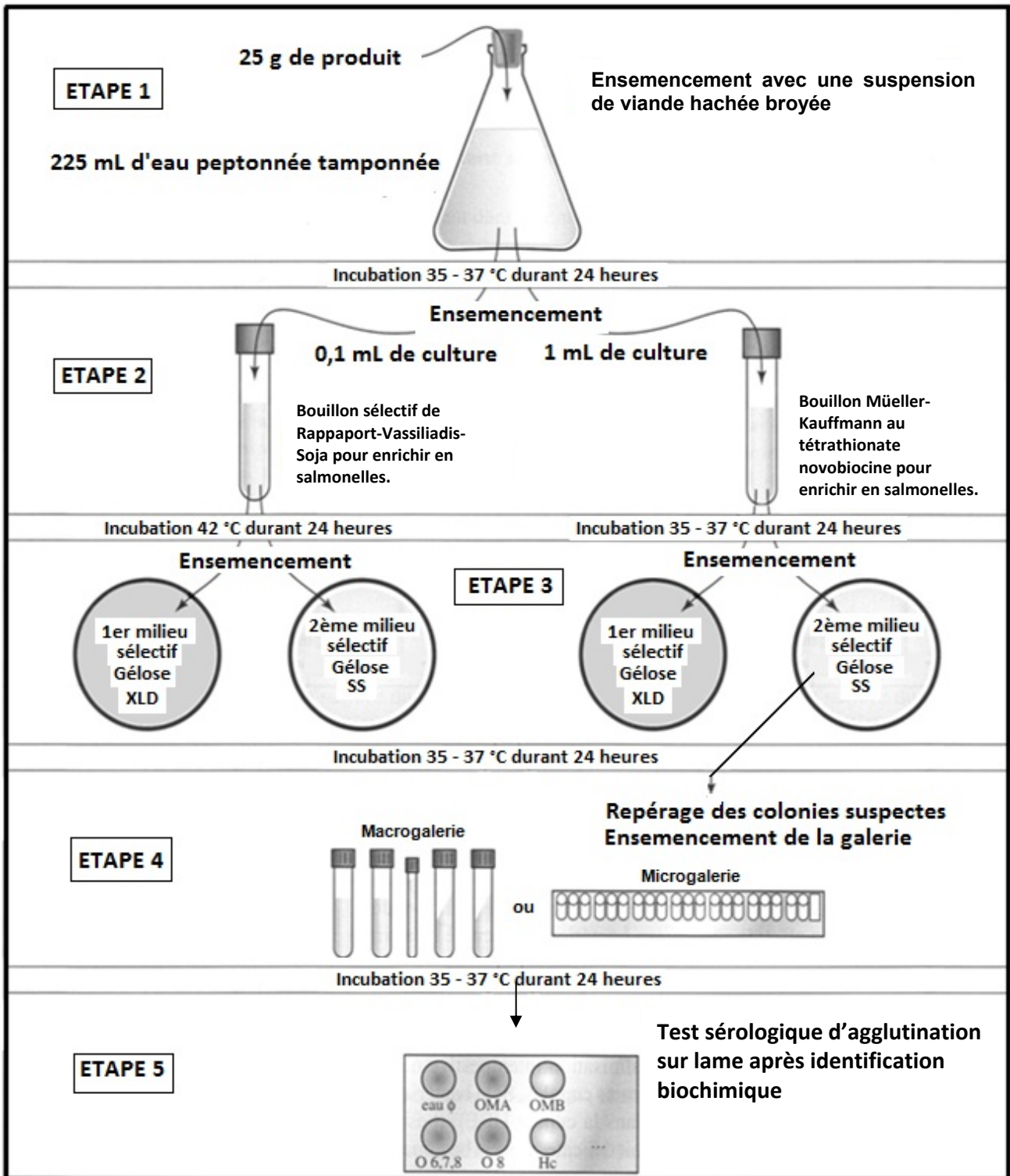
Q14. Interpréter les résultats obtenus pour les cinq unités.
Comparer ces résultats à ceux obtenus avec la méthode normalisée.

SYNTHESE

Q15. En accord avec les objectifs fixés par l'entreprise agro-alimentaire, choisir la méthode de recherche de *Salmonella* la plus adaptée et développer les arguments de ce choix.

DOCUMENT 1 - Plan d'étude de *Salmonella* selon la norme EN/ISO 6579

D'après "Microbiologie alimentaire, 5^{ème} édition" CRDP aquitaine - Ch. et J.N. Joffin



Gélrose XLD : Gélrose Xylose – Lysine – Désoxycholate

Gélrose SS : *Salmonella-Shigella*

DOCUMENT 2 - Fiche technique de la gélose *Salmonella-Shigella*

La gélose SS permet l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* à partir de produits alimentaires. Cependant, certaines bactéries comme *Pseudomonas*, *Yersinia enterocolitica* ou *Proteus* cultivent également sur ce milieu.

COMPOSITION	
Peptone	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Citrate de sodium	10,0 g
Citrate de fer III	1,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Vert brillant	3,3 mg
Rouge neutre	25 mg
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Agar	12,0 g
Eau	qsp 1 L
pH	7,3

LECTURE	
Lactose -	Colonies incolores
Lactose +	Colonies rouges
H ₂ S +	Colonies à centre noir
H ₂ S -	Colonies sans centre noir

DOCUMENT 3 - Caractères biochimiques de quelques espèces d'entérobactéries

H₂S	Uréase	Lactose	Souches d'entérobactéries
+	+	-	<i>Proteus mirabilis</i>
+	-	-	<i>Salmonella enterica</i>
+	-	+	<i>Citrobacter freundii</i>
-	+	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>
-	-	+	<i>Escherichia coli</i>

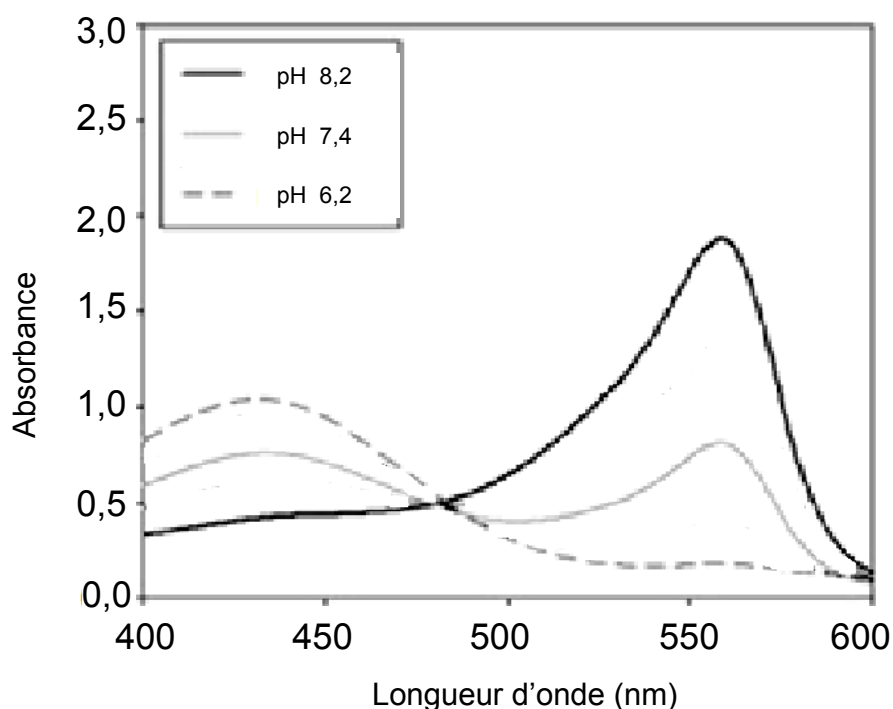
DOCUMENT 4 - Recherche de l'uréase

Fiche technique du milieu urée-tryptophane (ou urée-indole)

Composition	Technique	Interprétation	Conclusion
- Urée - Tryptophane - Phosphate - NaCl - Rouge de phénol - Éthanol - Eau Couleur du milieu stérile à pH 7 : orange	- À partir d'une colonie, réaliser une suspension de la bactérie à étudier dans quelques gouttes de milieu urée-tryptophane. - Incuber 2 à 4 h à 37 °C. - Observer le changement éventuel de couleur du milieu.	L'hydrolyse de l'urée par la bactérie provoque l'alcalinisation du milieu	Présence d'une uréase ⇒ Uréase +
		En absence d'hydrolyse de l'urée, pas de modification de pH	Absence d'une uréase ⇒ Uréase -

Spectre d'absorption de l'indicateur coloré du milieu urée tryptophane à différents pH

D'après "Process Biochemistry, volume 47, Issue 4, April 2012, Pages 597-605"



Relation entre longueur d'onde d'absorption maximale et couleur observée

Intervalle de longueur d'onde d'absorbance (nm)	[380 ; 420]	[430 ; 480]	[490 ; 560]	[590 ; 650]
Couleur de la solution	VERT	JAUNE	ROUGE	BLEU

DOCUMENT 5 - Analyse microbiologique de quelques denrées alimentaires

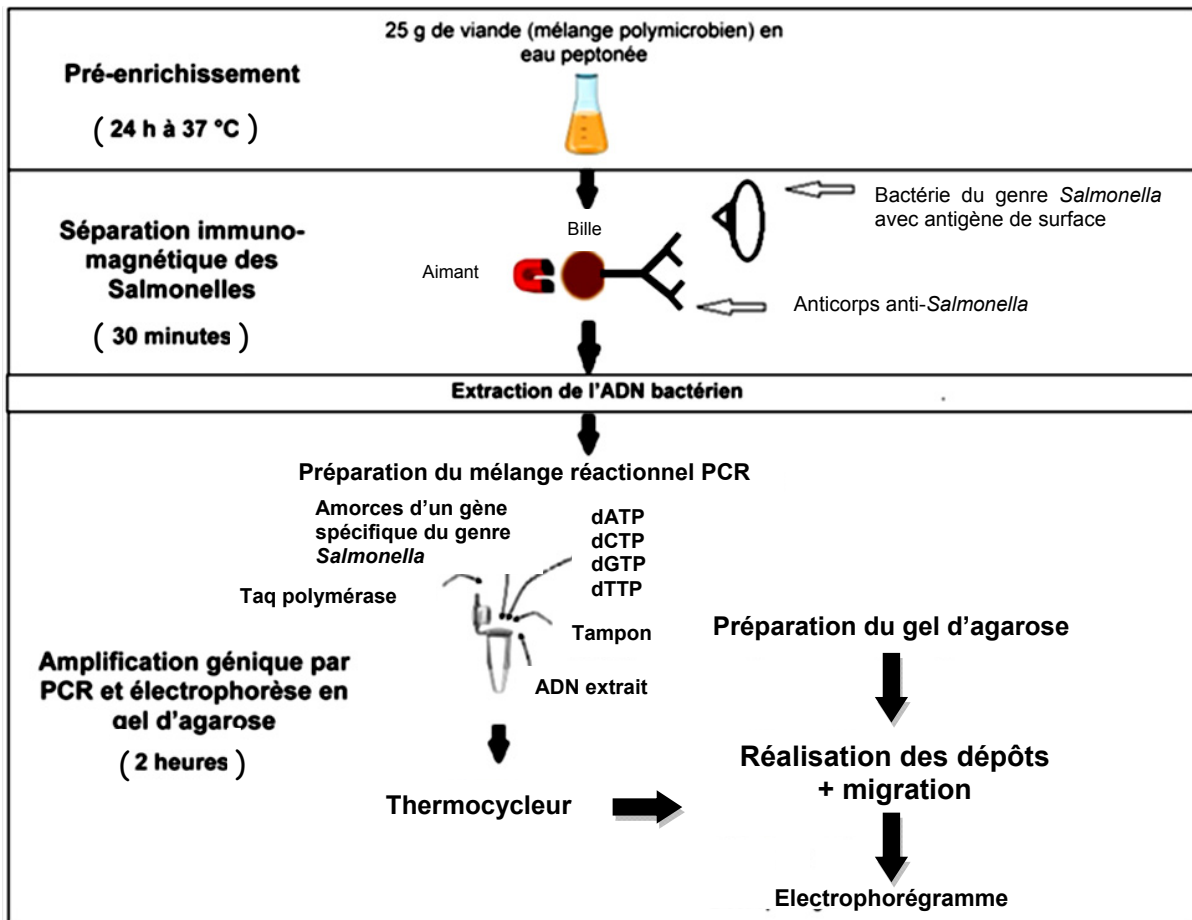
Catégorie de denrées alimentaires	Microorganismes	Nombre d'unités à analyser	Critère microbiologique	Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
Préparation en poudre pour nourrisson et aliments diététiques en poudre	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	Absence dans 10 g	ISO/DTS 22964	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Viande hachée et préparations de viande destinées à être consommées crues	<i>Salmonella</i>	5	Absence dans 25 g	EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à être consommées contenant des œufs crus	<i>Salmonella</i>	5	Absence dans 25 mL	EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

Qualité de la denrée alimentaire et recherche de *Salmonella* :

- La qualité du lot est satisfaisante en cas d'absence de la bactérie dans l'ensemble des unités analysées ;
- la qualité du lot est insatisfaisante si la présence de la bactérie est détectée dans au moins une unité analysée.

DOCUMENT 6 - Recherche de *Salmonella* par immuno-séparation et amplification génique (PCR)

Schéma des principales étapes du protocole



Résultats de l'électrophorèse des produits d'amplification à partir des 5 unités du lot n°06/2015

