



éduscol



Ressources pour le lycée général et technologique

Baccalauréat sciences et technologies de laboratoire

Sujet zéro Option biotechnologies Évaluation des compétences expérimentales

Contrôle de l'efficacité d'une opération de pasteurisation d'un lait utilisé pour la fabrication d'un fromage

Ces documents peuvent être utilisés et modifiés librement dans le cadre des activités d'enseignement scolaire, hors exploitation commerciale.

Toute reproduction totale ou partielle à d'autres fins est soumise à une autorisation préalable du Directeur général de l'enseignement scolaire.

La violation de ces dispositions est passible des sanctions édictées à l'article L.335-2 du Code la propriété intellectuelle.

Octobre 2012

Contrôle de l'efficacité d'une opération de pasteurisation d'un lait utilisé pour la fabrication d'un fromage

La pasteurisation est un procédé de traitement thermique modéré (par exemple, chauffage à 72-76°C pendant 20 secondes) permettant de détruire tous les microorganismes pathogènes et de réduire la flore totale. Ce traitement permet une meilleure conservation des aliments. Le chauffage détruit aussi la plupart des enzymes.

Un fromage est préparé à partir d'un lait pasteurisé LP.

Pour contrôler l'efficacité du traitement thermique du lait pasteurisé (LP) utilisé pour la production d'un fromage, on se propose de mettre en œuvre 2 activités expérimentales:

- mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) du lait LP par une méthode immunologique (document n°1) ;
- dénombrement des Entérobactéries du fromage fabriqué à partir de ce lait LP (document n°2).

Réflexion préalable et préparation de la situation expérimentale :

1. Dosage de la PAL du lait pasteurisé

- Après avoir lu le **document n°1**, compléter le tableau de préparation des étalons figurant sur le **document n°3** et le présenter à l'examineur pour validation.
- Construire le tableau des dépôts à réaliser : étalons et solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé.
- Réaliser un organigramme du mode opératoire..

2. Dénombrement des entérobactéries du fromage (document n°2)

- Donner la liste des réactifs et matériel nécessaires pour effectuer la manipulation décrite dans le document n°2.
- Indiquer la précaution à prendre concernant la température de la gélose VRBG utilisée pour le dénombrement.

Réalisations pratiques :

1. Dosage de la PAL du lait pasteurisé

Réaliser le dosage de la PAL sur la solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé en utilisant les **documents n°3(a)** et **3(b)**.

2. Dénombrement des entérobactéries du fromage

Réaliser le dénombrement des entérobactéries de la suspension mère du fromage S selon le **document n°2**.

Exploitations expérimentales :

1. Dosage de la PAL du lait pasteurisé

Le critère biochimique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation du lait est donné dans le **document n° 4(a)**.

Le logigramme d'acceptabilité des mesurages est donné dans le **document n°5**.

1.1. Tracer la droite d'étalonnage A à $405 \text{ nm} = f(c)$

1.2. Déterminer la concentration d'activité PAL en milli-unité par litre (mU/L) pour la solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé et en déduire la concentration d'activité PAL pour le lait pasteurisé (LP).

1.3. Conclure sur l'efficacité du traitement thermique à l'aide du document 4a. **Données** : $s_1 = 600 \text{ mU/L}$

2. Dénombrement des entérobactéries du fromage

Le critère microbiologique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation d'un fromage fabriqué à partir de lait pasteurisé est donné dans le **document n° 4(b)**.

Des résultats de dénombrement sont donnés dans le **document n°6**.

2.1. Calculer le nombre d'entérobactéries dans la suspension mère (S) du fromage et en déduire le nombre d'UC d'entérobactéries par gramme de fromage.

Rappel : on utilisera la formule donnée par la norme AFNOR

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- n_1 : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- n_2 : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

On choisira les boîtes comportant un nombre d'UFC compris entre 15 et 150.

2.2. Conclure en s'appuyant sur le document n°4(b).

3. Conclusion générale

A l'aide de l'ensemble des résultats, conclure sur l'efficacité du traitement thermique du lait.

Document n°1

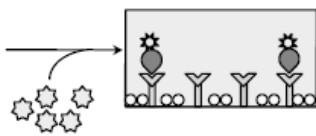
PAL Test Kit de dosage spécifique de la phosphatase alcaline bovine (PAL) dans les produits laitiers par méthode immunologique

Principe

1. Extraction de la PAL du lait : récupération dans la phase aqueuse après extraction au butanol.
2. Incubation dans les puits des plaques sensibilisées avec l'anticorps monoclonal anti PAL bovine.
3. Fixation spécifique de la PAL du lait de vache
4. Lavages élimination des PAL fongiques, bactériennes, des inhibiteurs et autres molécules non fixées



5. Ajout du substrat paranitrophénylphosphate (pNPP) ou 1-4 nitrophénylphosphate



Développement d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de PAL capturée par l'anticorps monoclonal anti PAL bovine

pNPP

6. Après addition de la solution d'arrêt, l'absorbance est lue à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les résultats sont exprimés en milli-unité par litre (mU/L).

Réactif et matériel

- Barrette de 16 puits sensibilisés avec un anticorps monoclonal spécifique de la PAL du lait de vache ;
- Adhésif pour barrettes 16 puits ;
- Réactif **R1** : Tampon de dilution pour la gamme et les échantillons ;
- Réactif **R2** : Solution mère étalon à 600 000 mU/L ;
- Réactif **R3** : Tampon de lavage ;
- Réactif **R4** : Substrat pNPP à 1 mg/mL ;
- Réactif **R5** : Solution d'arrêt 1,5M NaOH.

Mode opératoire

Extraction de la PAL du lait : DEJA REALISEE.

Agiter vigoureusement l'échantillon afin d'en assurer l'homogénéité puis :

1. Prélever 3 mL de lait à l'aide d'une pipette automatique et les verser dans un tube en verre à usage unique. Ajouter 3 mL de butanol-1. Boucher le tube puis agiter vigoureusement à la main 5 à 10 s. Vortexer pendant 30 s. Centrifuger pendant 30 minutes entre 2500 g et 3500 g.
2. Récupérer la phase aqueuse sous le disque de crème à l'aide d'une pipette.
3. Diluer la phase aqueuse à l'aide du tampon de dilution R1 au 1/20.

Cette solution appelée LD est fournie au candidat.

Préparation des étalons

Préparer une solution fille à 15 000 mU/L comme suit : 50 µL R2 + 1950 µL R1.

A partir de la solution fille à 15 000 mU/L, préparer les étalons (Et1 à Et4) suivants : 5000, 3000, 1000 et 500 mU/L.

Dosage

Il est recommandé d'analyser les étalons en simple et les échantillons en double.

Une barrette sensibilisée dont les puits sont remplis de solution de lavage est fournie.

1. Eliminer le tampon de lavage par retournement. Sécher en tapant la plaque retournée sur du papier absorbant.
2. Distribuer **100 µL** par puits des étalons ou échantillons dans les puits correspondants.
3. Recouvrir la plaque à l'aide de l'adhésif. Incuber **30 minutes sous agitation douce**.
4. Vider le liquide contenu dans les puits par retournement. Distribuer 300 µL de tampon de lavage (**R3**) dans chaque puits. Vider le liquide de lavage par retournement. Répéter l'opération 3 fois. Après le dernier lavage, éliminer les gouttelettes résiduelles en tapant la plaque retournée sur du papier absorbant propre et sec. *NB : Ne pas laisser sécher les puits entre deux étapes*
5. Distribuer **100 µL** de substrat (**R4**) dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques. Incuber **45 min** à 35-38°C.
6. Distribuer **50 µL** de solution d'arrêt (**R5**) dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques.
7. Retirer l'adhésif et lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Document n°2 :

Dénombrement des entérobactéries en milieu gélosé

Milieu utilisé : Gélose VRBG

Ingrédient	Quantité
Peptone pepsique de viande	7,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Glucose	10,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	30,0 mg
Cristal violet	2,0 mg
Agar agar bactériologique	13,0 g
Eau	Qsp 1 L

pH 7,4 ± 0,2

Mode opératoire

Préparation de la suspension mère de fromage

Une suspension mère de fromage est obtenue en broyant 10 g de fromage dans 90 mL de diluant.

La suspension S est fournie au candidat

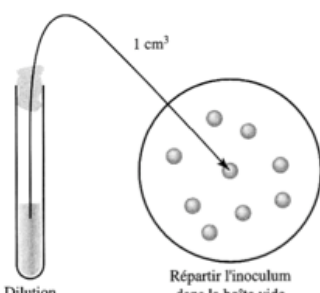
Dilutions décimales de l'échantillon

Préparer 2 dilutions décimales du lait pasteurisé fourni : 10^{-1} , 10^{-2}

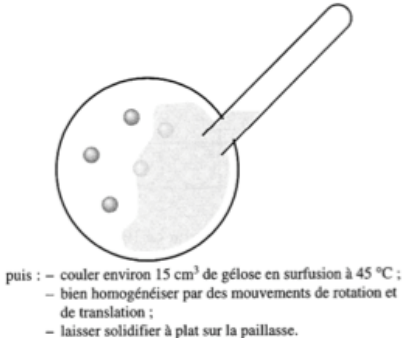
Ensemencements

Réaliser un ensemencement en double essai de la suspension mère de fromage et de chaque dilution décimale de cette suspension selon le protocole suivant.

1. Homogénéiser la dilution à prélever.



2. Prélever 1 mL.



3. Déposer la dilution dans le fond de la boîte vide en la répartissant en gouttes.

4. Couler aseptiquement environ 15 mL de gélose maintenue en surfusion à 45°C Homogénéiser par des mouvements de rotation et de translation. Laisser refroidir la gélose. Incuber 24 h à 37°C.

Lectures

Les entérobactéries présentent des colonies violet-rouges, entourées ou non d'un halo violet de sels biliaires précipités.

Document n°3

Préparation des étalons

Document à présenter à l'examinateur

	Et1	Et2	Et3	Et4
$C_{\text{étalon}}$ (mU/L)	5000	3000	1000	500
Solution fille à 15 000 mU/L (μ L)				
R1 (μ L)	200	300	700	725

Document n°4

Document n°4(a) : Critère biochimique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation du lait

Grandeur mesurée	Limite	Stade d'application du critère	Action en cas de résultat insatisfaisant
Activité de la phosphatase alcaline	< 700 mU/L	Fin du procédé de fabrication	Contrôle du traitement thermique

Document n°4(b) : Critère microbiologique d'acceptabilité pour un fromage à base de lait ayant subi un traitement thermique

Micro-organismes	Plan échantillonnage		Limites		Méthodes d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultat insatisfaisant
	n	c	m	M			
Entérobactéries	2	1	100 ufc/g	1000 ufc/g	ISO 21528-2	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique de la matière première et prévention de la recontamination

n : nombre d'unités formant l'échantillon, devant être prélevé au hasard dans un lot. *n* représente la taille de l'échantillon.

c : représente le nombre maximal permis d'unités d'échantillon de qualité acceptable. Si le nombre d'unités de qualité acceptable est supérieur à *c*, le lot d'où provient l'échantillon est inacceptable.

m : limite des concentrations de microorganismes correspondant à une qualité microbiologique satisfaisante, concentrations habituellement exprimées par nombre d'UFC (unités formant colonie) par g ou mL.

M : limite des concentrations insatisfaisantes de microorganismes, habituellement exprimées par nombre d'UFC par g ou mL. Son dépassement correspond à des conditions inacceptables, non contrôlées et/ou présentant un risque pour la santé, selon le critère. *M* distingue les unités de qualité acceptable de celles qui sont de qualité insatisfaisante. Si la valeur d'une seule unité d'échantillon est supérieure à *M*, l'unité d'échantillon ou le lot d'où provient l'échantillon est inacceptable.

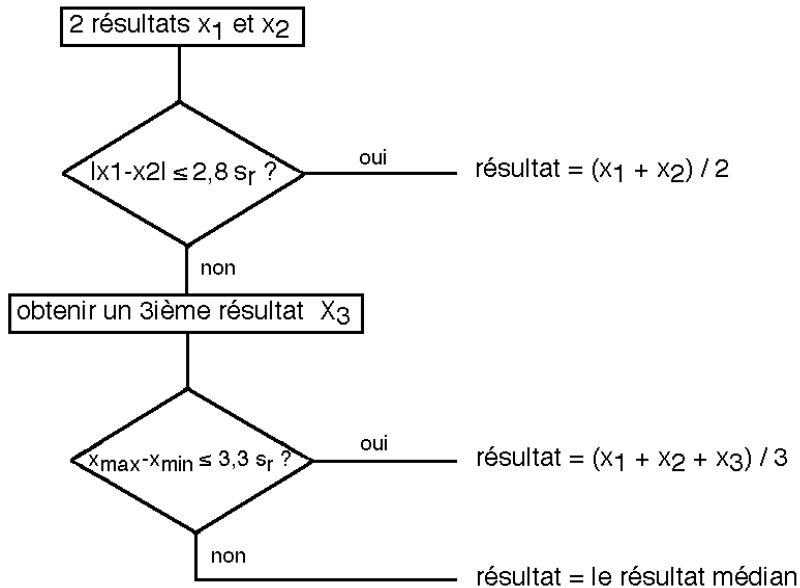
Interprétation selon un plan à 3 classes



Document n°5

Acceptabilité des résultats d'essais

Plan à 2 résultats obtenus pour débiter et troisième résultat supplémentaire éventuellement déterminé (en condition de répétabilité)



Document n°6

Résultats du dénombrement des entérobactéries pour la suspension mère de fromage

Dilution de la suspension mère S du fromage	100	10-1	10-2
Essai 1 (nombre d'UFC)	123	18	1
Essai 2 (nombre d'UFC)	102	20	2

Matière d'œuvre

1. Dosage de la PAL

Réactifs :

- Une barrette 8 puits à sensibiliser à la SAB :

Placer dans chaque puits 200µL de SAB à 100µg/mL dans du tampon Carbonate-bicarbonate: à pH alcalin, la SAB se fixe au fond des puits. Rincer au tampon carbonate-bicarbonate, la SAB non fixée est éliminée. Saturer le plastique avec du lait UHT. Rincer l'excès de lait avec le tampon carbonate-bicarbonate.

- « Réactif R1 » (tampon de dilution) : 10 mL de tampon PBS
- « Réactif R2 » (Solution mère étalon à 600 000 mU/L) : Anticorps anti-SAB couplé à la PAL (ref. : ABIN799945 chez « anticorps en ligne »)100µL
- « Réactif R3 » (tampon de lavage) : 15mL de tampon PBS +Tween
- « Réactif R4 » (substrat pNPP) : à 1 mg/mL en tampon Tris-HCl à 1 mol/L, pH = 9,8 : 1 mL
- « Réactif R5 » (solution d'arrêt) : NaOH 1,5 M 0,5 mL
- Solution « LD » : R2 au 1/600 ème , 500µL (environ 1 000 mU/L)

Matériel :

Par élève:

- Une barrette 8 puits ;
- Adhésif ;
- Cadre de fixation pour barrette ;
- Tubes Eppendorf pour la dilution des étalons : 5 (un pour la pré-dilution, 4 pour la gamme)
- Papier absorbant.

Pour 2 :

- Micropipettes de précision : 50 – 1000 µL et cônes jetables adaptés ;
- Petite bassine ou autre récipient pour vider les liquides de rinçage ;

Pour la classe :

- Agitateur pour microplaque ;
- Lecteur de microplaques avec filtre 405 nm ;
- Etuve régulée 35-38°C ;

2. Dénombrement des entérobactéries

Réactifs :

- Tubes de 9mL d'eau physiologique stérile : 6
- Tubes de 15mL de gélose VRBG en surfusion : 6
- « suspension-mère S » : laitensemencé avec *E. coli* 100 /mL en tube de 10mL : 3mL

Matériel minimum :

Par élève :

- 6 boîtes de Pétri stériles ;
- 4 pipettes graduées stériles de 1mL ; (2 pour les dilutions, 2 pour les ensemencements)

Pour 2 :

- Vortex

Tableau d'évaluation

ACTIVITÉS. TACHES	ELEMENTS D'ÉVALUATION	C1 S'appropriier			C2 Analyser			C3 Réaliser			C4 Valider			C5 Communiquer			C6 Autonomie initiative		
		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Dosage de la PAL du lait pasteurisé		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Préparer des solutions étalons	Détermine le volume des solutions de l'enzyme correct dans le tableau																		
Construire un tableau de dépôts	Réalise un tableau (contenu avec les étalons, deux essais pour la solution LD et présentation de ce tableau)																		
Construire un organigramme du mode opératoire	Réalise un organigramme : analyse du protocole ; présentation des différentes étapes de ce protocole et des durées d'incubation																		
Réaliser le dosage de la PAL	Utilise correctement le matériel pipetage Obtient des points de la gamme étalon alignés																		
	Réalise les différentes étapes du protocole en respectant les temps d'incubation																		
	Obtient des résultats des essais justes																		
Tracer la droite d'étalonnage	Trace la droite d'étalonnage sur papier millimétré ou à l'aide d'un logiciel (axes légendés, échelle, report des points expérimentaux...)																		
Rendre un résultat	Elabore l'équation aux grandeurs en tenant compte de la dilution l'équation aux unités et l'équation aux valeurs numériques																		
	Applique l'annexe 5 pour l'étude de l'acceptabilité d'un résultat																		

ACTIVITÉS. TACHES	ELEMENTS D'ÉVALUATION	C1 S'appropr ier			C2 Analyser			C3 Réaliser			C4 Valider			C5 Communi quer			C6 Autonomi e initiative		
	Exprime le résultat définitif avec la bonne unité, un arrondi correct																		
Conclure	Compare le résultat à un critère de référence																		
	Interprète un résultat Conclut que le lait n'a pas été correctement pasteurisé.																		
Dénombrement des entérobactéries du fromage		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Dresser la liste des réactifs et matériel	Réalise une liste complète et précise																		
Identifier un point critique	Établit une réponse correcte sur les précautions à prendre par rapport à la température de la gélose																		
Réaliser le dénombrement des entérobactéries	Maîtrise la technique de dilution en série Maîtrise la technique d'ensemencement dans la masse Obtient des résultats conformes aux résultats du groupe																		
Rendre un résultat	Effectue le choix des boîtes pour le calcul de N Prend en compte la dilution pour l'équation aux grandeurs, l'équation aux valeurs numérique Exprime un résultat définitif avec la bonne unité, un arrondi correct et une incertitude																		
Conclure	Compare le résultat à des critères de référence																		
	Interprète un résultat Conclut que la qualité du fromage est non satisfaisante																		

ACTIVITÉS. TACHES	ELEMENTS D'ÉVALUATION	C1 S'approprier			C2 Analyser			C3 Réaliser			C4 Valider			C5 Communiquer			C6 Autonomie initiative		
		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Exploitation		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Conclure sur l'ensemble du sujet	Synthétise et conclut dans le contexte en fonction des résultats obtenus																		
Organisation - Prévention des risques		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M
Utiliser correctement et mettre en œuvre les équipements de protection individuels et collectifs	Sait gérer les déchets																		
Organisation du poste de travail (individuel et collectif) en fonction de l'activité	Installe et remet en état du poste de travail pour chaque manipulation.																		
PONDÉRATION DE CHAQUE COMPÉTENCE		2			4			6			4			2			2		
NOTE OBTENUE PAR LE CANDIDAT																			
TOTAL : NOTE / 20																			

Commentaires :

Les éléments d'évaluation, concernent des parties de l'activité, choisis pour être évalués. Il s'agit d'un sondage parmi l'ensemble des éléments évaluables.

Ce tableau présente donc des éléments d'évaluation qui peuvent sembler très nombreux.

Un des intérêts du sujet 0 est de s'approprier la nouvelle démarche d'évaluation par compétences.

Les concepteurs de sujets seront probablement amenés à faire des choix pour permettre une évaluation adaptée à la durée de l'épreuve et au niveau du baccalauréat.

La fréquence des cases grisées a permis de déterminer la pondération de chacune des compétences.

Pour attribuer une note au candidat, chacune des six compétences sera examinée en regardant globalement à l'aide de la position et de la fréquence des croix dans les zones grisées.