

# BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2013

Evaluation des compétences expérimentales

DOSSIER TECHNIQUE

**Fiches techniques :**

- Fiche technique 1 : Dosage des nitrites dans un salami par la méthode colorimétrique de diazotation.
- Fiche technique 2 : Dénombrement des coliformes thermotolérants en milieu VRBL

**Documents :**

- **Document 1** : Spectre d'absorption du complexe coloré (dosage des nitrites par le réactif de diazotation)
- **Document 2** : Fiche de sécurité du réactif de diazotation
- **Document 3** : Gélose VRBL (Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)
- **Document 4** : Interprétation selon un plan à trois classes
- **Document 5** : Aide mémoire de métrologie.

**Fiches techniques à fournir par le centre :**

- **Notice** d'utilisation du spectrophotomètre

Le dosage dans un salami est basé sur une méthode spectrophométrique. Le mesurande est la masse de nitrites par kilogramme de salami.

En présence du réactif de diazotation, les nitrites produisent un complexe coloré capable d'absorber la lumière à la longueur d'onde de 537nm. Le spectre d'absorption de ce complexe est présenté dans le **document 1**.

### 1 – Réactifs et matériels

- Solution étalon fille de nitrites étiquetée « F »
- Solution de l'échantillon à analyser étiquetée « S »
- Réactif de diazotation
- Pipette graduée 2 mL
- Cuves pour spectrophotométrie
- Film étirable
- Spectrophotomètre

### 2-Echantillon à analyser

20 g de salami ont été traités afin d'extraire les ions nitrites. On obtient la solution S de volume total 500 mL. Un aliquote de cette solution étiquetée « S » est fourni.

### 3 - Gamme d'étalonnage

On dispose d'une solution étalon fille notée F à  $2,00 \text{ mg.L}^{-1}$  obtenue par dilution d'une solution mère de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) à  $0,100 \text{ g.L}^{-1}$  étiquetée « M ».

### 4 - Protocole opératoire

Réaliser, en cuve, le dosage des nitrites, en respectant le tableau suivant :

<b>Tubes</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>E<sub>1</sub></b>	<b>E<sub>2</sub></b>
Solution F (mL)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	-	-
Solution S (mL)	-	-	-	-	-	-	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>
H <sub>2</sub> O qsp 2 mL (mL)	2,0	1,6	1,2	0,8	0,4	0	<b>0</b>	<b>0</b>
Réactif de diazotation (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
<b>Quantité de nitrite par cuve (µg)</b>	<b>0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>2,4</b>	<b>3,2</b>	<b>4,0</b>		

Homogénéiser. Laisser la coloration se développer 20 minutes.

Mesurer les absorbances à la longueur d'onde de 537 nm contre le tube témoin.

#### Données :

- Ecart type de répétabilité :  $s_r = 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$
- Incertitude type composée :  $u_c = 0,05 \text{ mg.L}^{-1}$

D'après la norme 7218 : 2007 pour les laboratoires certifiés assurance qualité ISO 17025, le dénombrement des coliformes thermotolérants s'effectue en simple essai, dans la masse d'une gélose VRBL.

### 1- Préparation de l'échantillon à analyser (déjà réalisé)

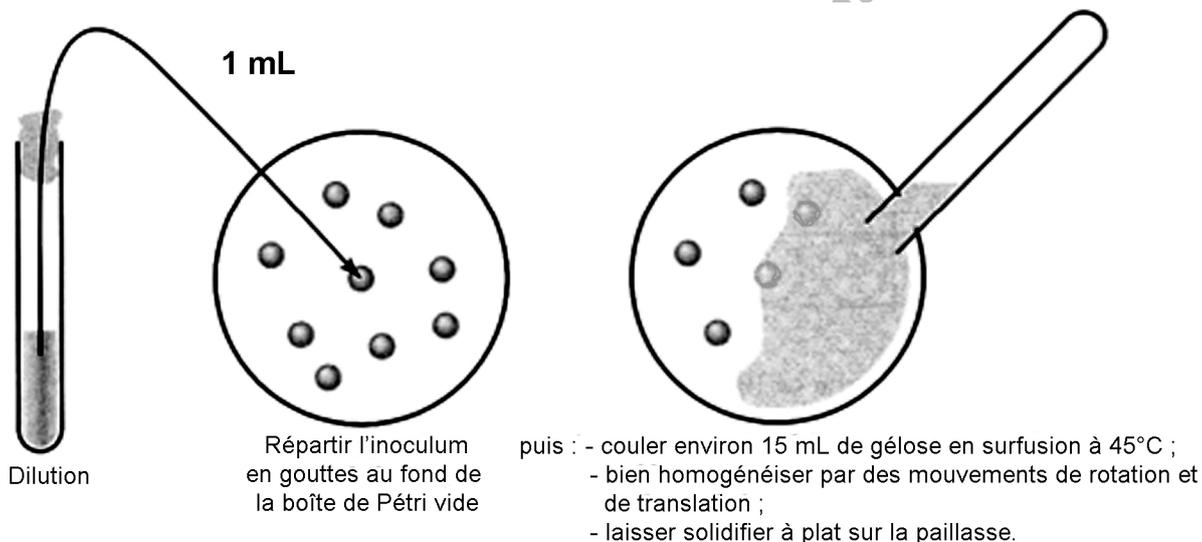
- 25 g de salami tranché sont pesés dans un sac stérile. 225 mL d'eau peptonée tamponnée sont ajoutés stérilement. L'ensemble est broyé au stomacher et constitue le broyat A.

### 2- Dilutions décimales de l'échantillon

- Préparer deux dilutions successives au 1/10ème du broyat A (dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ). Les tubes fournis pour ces dilutions contiennent 9 mL d'eau peptonée.

### 3 - Ensemencements

- Réaliser un ensemencement en simple essai du broyat A et des deux dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ , dans la masse d'une gélose VRBL.



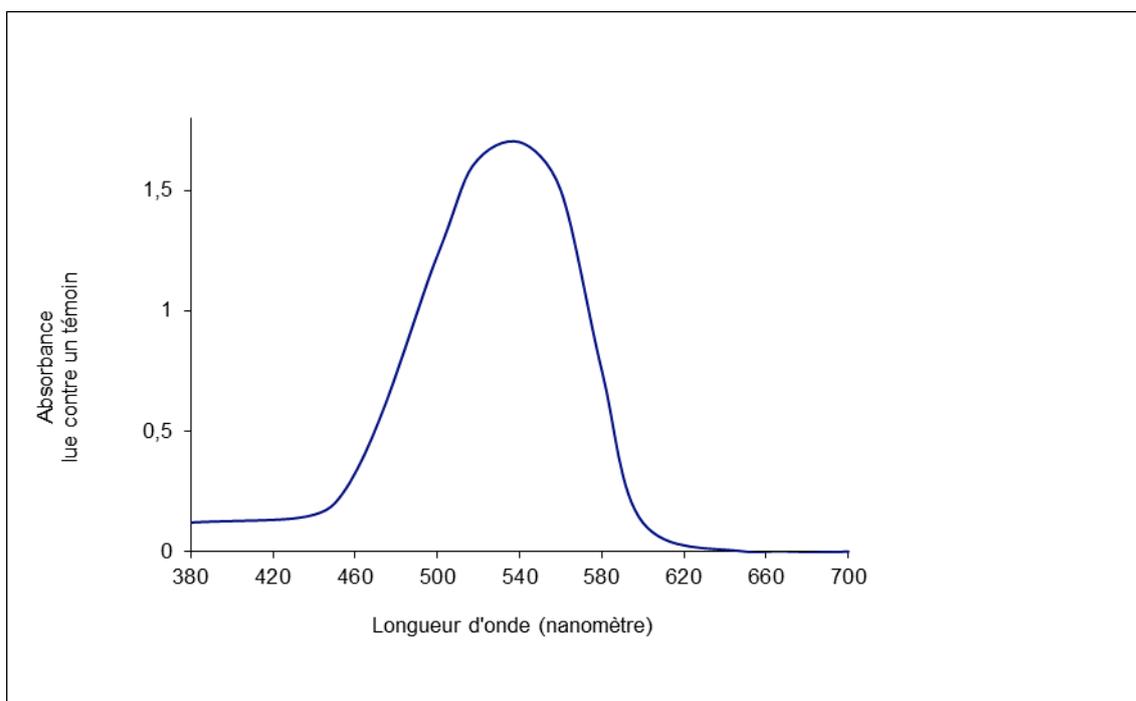
- Incuber 24 heures à la température choisie.
- Dénombrer les colonies sur les boîtes contenant entre 10 et 150 sur ce milieu avec indicateur de pH.

### 3 – Calcul de la concentration en coliformes thermotolérants

La formule préconisée par l' AFNOR est utilisée pour exprimer le résultat :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V \times (n_1 + 0.1n_2) \times d_1}$$

$N$  : Nombre d'UFC par gramme ou par mL de produit initial  
 $\sum \text{colonies}$  : Somme des colonies des boîtes interprétables  
 $V$  : volume de solution déposée  
 $n_1$  : nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue  
 $n_2$  : nombre de boîte considéré à la seconde dilution retenue  
 $d_1$  : facteur de la première dilution retenue

**DOCUMENT 1****Spectre d'absorption du complexe coloré  
(dosage des nitrites par le réactif de diazotation)****DOCUMENT 2****Fiche de sécurité du réactif de diazotation**

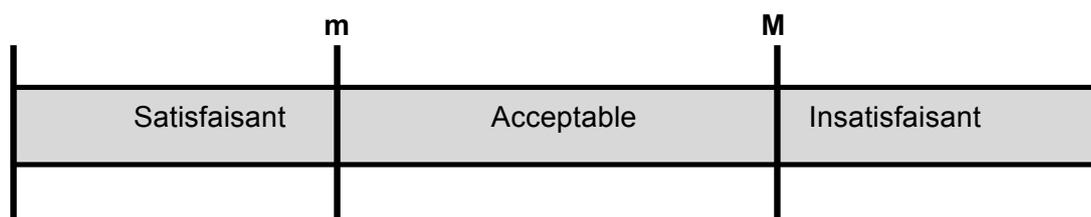
Pictogrammes de sécurité :



Mentions de dangers : H314 : provoque des brûlures de la peau et de graves lésions oculaires.

H315 : provoque une irritation cutanée.

H319 : provoque une sévère irritation des yeux.

**DOCUMENT 4****Interprétation selon un plan à trois classes**

Remarque : la norme pour les coliformes thermotolérants indique :  $m = 100 \text{ UFC.g}^{-1}$  et  $M = 1000 \text{ UFC.g}^{-1}$

<b>DOCUMENT 3</b>	<b>Gélose VRBL</b> <b>(Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)</b>
-------------------	--

### 1- Micro-organismes mis en évidence

Recherche et dénombrement des coliformes totaux et/ou thermotolérants.

- Coliformes totaux.

Un coliforme est une entérobactérie fermentant le lactose à 30 ou 37 °C avec production de gaz.

- Coliformes thermotolérants.

Un coliforme thermotolérant est une entérobactérie fermentant le lactose à 44 °C avec production de gaz.

### 2- Domaines d'utilisation - Intérêt

Analyses d'eau, de produits laitiers et autres produits alimentaires.

Recherche d'une contamination fécale (coliformes totaux).

Recherche d'une contamination fécale récente (coliformes thermotolérants).

### 3- Composition (pour 1 litre)

Constituants	Quantité
Tryptone (peptone)	7,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Lactose	10,0 g
Sels biliaires (agent sélectif)	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	30 mg
Cristal violet (agent sélectif)	2 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g

pH  $7,4 \pm 0,2$

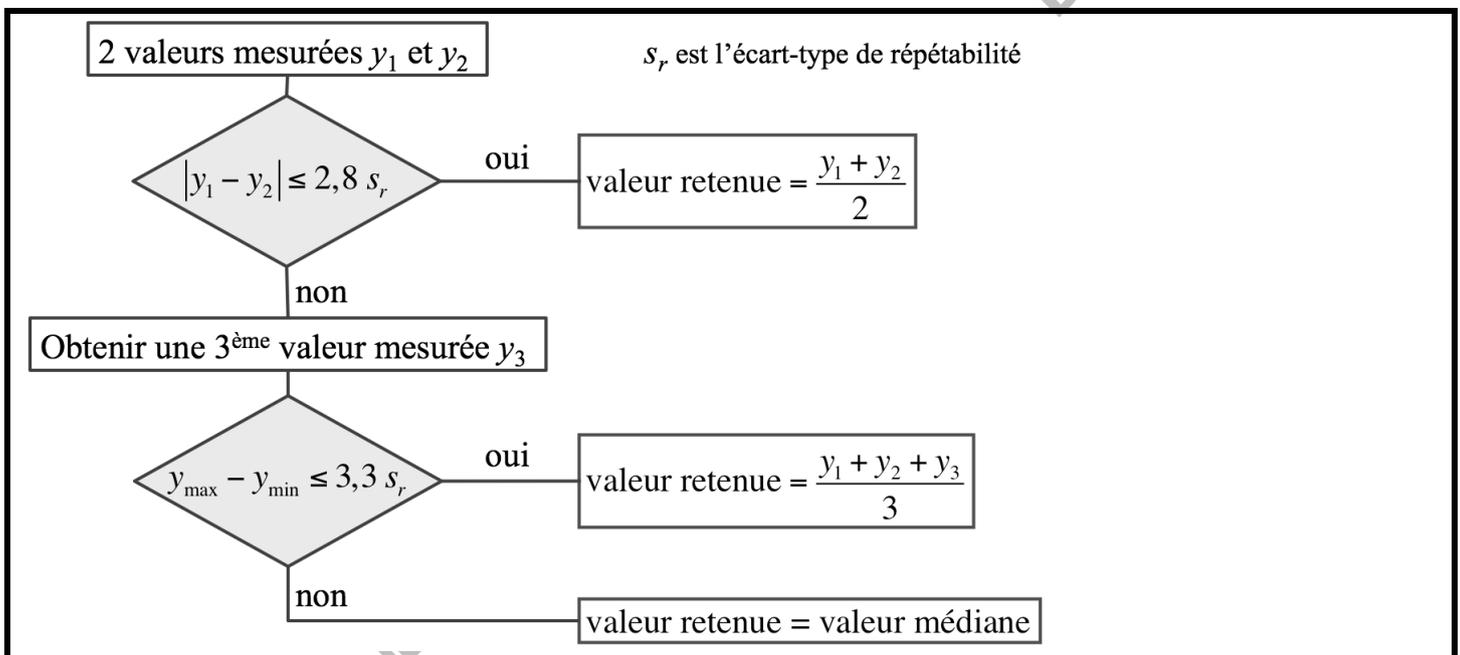
### 4- Lecture

Toutes les colonies rouges (lactose +) d'un diamètre minimum de 0,5 mm en 24 heures sont considérées comme étant des coliformes.

Le milieu contient un indicateur coloré, la norme 7218 : 2007 préconise donc de prendre en compte les boîtes contenant entre 10 et 150 colonies.

**Extraits du Vocabulaire International de Métrologie (VIM) :**

- Le **mesurande** est la grandeur que l'on souhaite mesurer.
- Le **mesurage** est un processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs pouvant être raisonnablement attribuées à une grandeur.
- **Les indications** sont des valeurs numériques rendues par des appareils de mesure
- Le **résultat de mesure** est exprimé par la valeur retenue et l'incertitude de mesure associée, complétée par toutes les autres informations pertinentes disponibles.
- **Les conditions de répétabilité** sont des conditions de mesurage qui comprennent des mesurages répétés par le même opérateur sur le même objet, avec la même procédure de mesure, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement, dans le même lieu, pendant une courte période de temps.

**Logigramme de compatibilité en répétabilité à deux ou trois valeurs****Expression du résultat de mesure**

L'incertitude élargie  $U$  est calculée en multipliant l'incertitude-type composée  $u_c$  par le facteur d'élargissement  $k$  associé à un niveau de confiance donné. La valeur de  $k$  généralement utilisée est de 2, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

L'incertitude élargie  $U$  est ensuite arrondie selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

Dans certains cas, l'incertitude élargie  $U$  est directement donnée avec son niveau de confiance.

Pour l'arrondissement du résultat, le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

**Grandeur mesurée = (valeur retenue  $\pm$   $U$ ) unité**  
Autres informations pertinentes disponibles.