

Microbiologie et technologies d'analyse

Objectifs

L'enseignement de la microbiologie a pour objectifs essentiels :

- de comprendre les implications des microorganismes au cœur du secteur professionnel concerné, que ces microorganismes interviennent dans la fabrication de bioproduits ou qu'ils en soient les contaminants ;
- de comprendre les méthodologies des analyses et contrôles pratiqués sur les chaînes de fabrication et sur les bioproduits ;
- de connaître et de justifier les règles d'hygiène mises en œuvre dans les bioindustries.

L'enseignement s'articule en modules que l'on peut séparer en deux groupes :

- premier groupe : des modules de connaissances fondamentales indispensables à l'exercice et à l'évolution de l'activité professionnelle ainsi qu'à d'éventuelles poursuites d'études, traités en relation avec les bio-industries :
 - o le monde microbien ;
 - o la physiologie des microorganismes ;
 - o les agents chimiques antimicrobiens ;
 - o la systématique des microorganismes.
- deuxième groupe : des modules de connaissances spécifiques qui confèrent au titulaire du diplôme des savoirs particulièrement adaptés aux domaines professionnels concernés par les bioanalyses et contrôles :
 - o les flores utiles en microbiologie industrielle ;
 - o les agents d'altération de la qualité marchande et sanitaire des bioproduits ;
 - o la prévention des biocontaminations et les contrôles des bioproduits.

Le cours de microbiologie doit impérativement être articulé avec l'enseignement des autres disciplines biologiques, en particulier les cours de sciences et technologies bioindustrielles et de biologie cellulaire et moléculaire.

Les activités technologiques en analyse microbiologique et les opérations unitaires en microbiologie compléteront les éléments du cours et mettront en œuvre les techniques d'analyse et de contrôles relatives aux méthodologies présentées.

Module 1
Le monde microbien dans les secteurs
Alimentaire, cosmétique et pharmaceutique

Contenus	Commentaires
<p>1. Classification des êtres vivants</p>	<p>On se limitera à la présentation de l'arbre phylogénétique des êtres vivants et de l'arbre phylogénétique des eubactéries. On établira une comparaison entre cellules eucaryote et procaryote. Les critères de classification des eubactéries seront évoqués puis repris dans le module 4.</p>
<p>2. Les microorganismes eucaryotes</p> <p>2.1. Les microalgues</p> <p>2.2. Les protozoaires</p> <p>2.3. Les champignons microscopiques</p> <p>- La cellule fongique :</p> <ul style="list-style-type: none"> . organisation en hyphes, le thalle ; . organes de dissémination et de reproduction. <p>- Principaux critères d'identification</p>	<p><i>Les structures et ultrastructures des cellules eucaryotes seront étudiées en cours de biologie cellulaire et moléculaire.</i></p> <p>Classification simplifiée ; structure schématisée d'une algue unicellulaire.</p> <p>Etude simplifiée des principaux groupes : Ciliés, Flagellés, Rhizopodes, Sporozoaires.</p> <p>Structure schématisée des différentes formes : levure, hyphes, mycélium.</p> <p>Classification phénotypique simplifiée.</p> <p>A partir d'un exemple, on étudiera les cycles de reproduction d'une levure et d'un champignon filamenteux.</p>
<p>3. Les microorganismes procaryotes : les bactéries</p> <p>3.1. Formes et groupements</p> <p>3.2. Eléments structuraux spécifiques intervenant dans les phénomènes de résistance, dissémination, reconnaissance, attachement, fixation.</p> <p>3.2.1. La paroi</p>	<p>On exploitera les résultats des observations de morphologies microscopiques par état frais et par colorations effectuées en laboratoire.</p> <p><i>Les structures et ultrastructures, de la membrane plasmique, du cytoplasme et des ribosomes, du génome, seront étudiées dans le cours de biologie cellulaire et moléculaire.</i></p> <p>Pour cette étude, on prendra appui sur des exemples concernant les bioindustries.</p> <p>On présentera les différentes structures pariétales et leurs rôles.</p> <p>On présentera l'architecture de la membrane externe des bactéries Gram négatif.</p> <p>La nature des unités constitutives devra être connue, mais les formules ne seront pas exigées.</p>

3.2.2. La capsule	On indiquera sa nature chimique.
3.2.3. Les polymères extracellulaires	On évoquera ses rôles dans la colonisation des milieux et la résistance à la phagocytose.
3.2.4. Les endospores	On présentera des exemples de polymères de surface liés et libérés.
3.2.5. Les plasmides	L'étude détaillée des étapes de la sporulation ne sera pas envisagée. La structure de la spore et les conditions de sporulation et de germination seront développées.
3.2.6. Les flagelles	On indiquera leurs caractéristiques fonctionnelles. On insistera sur les avantages sélectifs et les capacités d'adaptation conférés par les plasmides : résistance, avantages métaboliques, virulence... <i>Les caractéristiques structurales, de même que le transfert plasmidique, seront étudiés en cours de biologie cellulaire et moléculaire.</i>
3.2.7. Les pili d'adhésion	On présentera les types de ciliature, l'architecture globale, la nature chimique, les rôles des flagelles. On indiquera les principes généraux de leur fonctionnement. On présentera des exemples d'adhésines et de récepteurs intervenant dans les phénomènes d'adhésion à la muqueuse intestinale.

Module 2

Physiologie des microorganismes

Contenus	Commentaires
1. Besoins nutritionnels	
1.1. Besoins élémentaires : source de carbone, d'azote, d'énergie, de soufre, de phosphore et d'éléments minéraux	On définira et on illustrera les termes d'autotrophie, d'hétérotrophie, de phototrophie et de chimiotrophie.
1.2. Besoins en facteurs de croissance	On définira et on illustrera les termes de prototrophie et d'auxotrophie.
1.3. Interactions nutritionnelles entre populations microbiennes	On décrira un exemple de synergie, de compétition et d'antagonisme.
1.4. Applications à la conception et à l'utilisation des milieux de culture	On prendra des exemples de milieux industriels et de milieux de culture utilisés en laboratoire et on montrera comment ces milieux répondent aux différentes exigences nutritionnelles.
2. Métabolismes	<i>Ce cours devra prendre en compte les acquis du cours de biochimie présentant les voies métaboliques classiques : glycolyse, voie des pentoses phosphate, cycle de Krebs, β oxydation.....</i>

<p>2.1. Métabolisme énergétique</p> <p>Types trophiques : phototrophes et chimiotrophes.</p> <p>2.2. Les fermentations : fermentations éthanolique, lactique, butyrique, propionique, butanediolique et des acides mixtes.</p> <p>2.3. Les autres voies cataboliques : catabolisme azoté, catabolisme lipidique.</p> <p>2.4. Les synthèses</p>	<p>Les mécanismes biochimiques de production d'ATP : photophosphorylation, phosphorylation oxydative et phosphorylation au niveau du substrat, étudiés en biochimie, seront revus globalement à cette occasion.</p> <p>Dans cette partie seront envisagés les métabolismes spécifiques des microorganismes : respirations aérobie et anaérobie, fermentations. Les fermentations et les produits obtenus par ces voies seront plus spécifiquement traités dans le paragraphe 2.2.</p> <p>On comparera brièvement la photosynthèse oxygénique et non oxygénique.</p> <p>On présentera globalement l'ensemble des voies de fermentations. On précisera les étapes des fermentations éthanolique, lactique, butyrique, propionique, butanediolique et des acides mixtes. On reliera ces fermentations avec leurs applications industrielles et analytiques.</p> <p><i>Toute application en bioindustries impliquant un métabolisme particulier sera étudiée dans le cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i></p> <p>Ces voies seront étudiées pour l'intérêt des composés produits dans les bioindustries. L'étude sera mise en relation avec celle des flores d'altération de la qualité marchande.</p> <p>Les voies, leurs régulations et les produits de synthèse (protéines, polyosides, acides aminés, vitamines, antibiotiques) intéressant les bioindustries sont abordés dans le module 5.</p>
<p>3. Croissance des micro-organismes</p> <p>Etude cinétique de la croissance en conditions définies et optimales.</p>	<p>On présentera une courbe de croissance en milieu non renouvelé par suivi d'absorbance.</p> <p>On déterminera les différentes phases.</p> <p>On définira les paramètres : temps de génération (G) et vitesse spécifique de croissance (Qx).</p> <p>On déterminera et on calculera les paramètres en utilisant une représentation logarithmique.</p> <p>On présentera le suivi de croissance par méthode pondérale et numération directe de cellules.</p> <p>Les croissances en milieu renouvelé seront étudiées lors des opérations unitaires correspondantes.</p>

Module 3

Agents antimicrobiens

Contenus	Commentaires
<p><i>L'étude des agents physiques (température, hygrométrie, rayonnements, composition de l'atmosphère particulière) et celle des procédés associés (stérilisation, pasteurisation, réfrigération, congélation, techniques d'abaissement de l'activité de l'eau (déshydratation), irradiation, conditionnement en atmosphère modifiée, de même que la filtration stérilisante) seront réalisées dans le cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i></p>	
<p>Pour chacun des agents envisagés l'étude comprend :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la nature chimique ; - le spectre d'activité et l'utilisation ; - le mode d'action cellulaire ; - les effets sur une population : effets microbiostatique et microbicide ; - les résistances éventuelles ; - la toxicité. 	<p>L'efficacité de ces agents sera étudiée au laboratoire conformément aux normes.</p>
<p>1. Les agents chimiques utilisés pour la conservation des bioproduits</p> <p>1.1. Conservation des aliments : le chlorure de sodium, le nitrate et le sel nitrité, l'anhydride sulfureux, les acides organiques (acide acétique, acide lactique, acide propionique...), l'éthanol, les polyols, le saccharose.</p> <p>1.2. Conservation des cosmétiques et des médicaments</p>	<p>On évaluera l'efficacité d'un conservateur par le « Challenge test » lors des activités technologiques en microbiologie.</p>
<p>2. Les agents chimiques utilisés dans les opérations de nettoyage et de désinfection : classification, propriétés et réglementation.</p> <p>2.1. Les détergents</p> <p>2.2. Les désinfectants</p>	<p>On déterminera le pouvoir bactéricide d'un désinfectant lors des activités technologiques.</p>
<p>3. Les agents chimiques utilisés en thérapeutique :</p> <p>3.1 Les antiseptiques</p>	<p>On déterminera le pouvoir bactéricide d'un antiseptique lors des activités technologiques.</p>

<p>3.2 Les antibiotiques Présentation générale des différentes familles.</p>	<p>On mettra en relation structure chimique et activité. Seront traités en activités technologiques de microbiologie et de biochimie :</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques : antibiogramme et détermination de CMI ; - la recherche d'un antibiotique dans un bioproduit (aliment) ; - le dosage d'un antibiotique dans un bioproduit ; - la croissance de microorganismes en présence d'un antibiotique ; - l'utilisation des antibiotiques dans les milieux de culture comme agents sélectifs.
--	--

Module 4

Systématique des microorganismes

Contenus	Commentaires
<p>1. Principe et méthodes de la taxonomie bactérienne</p> <p>1.1. Supports de la classification phénotypique</p> <p>1.2. Supports de la classification génotypique</p>	<p>On envisagera :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la structure et la composition de la paroi ; - les antigènes somatiques et flagellaires. <p>On envisagera pour les acides nucléiques : GC%, ARN 16 S, hybridations, profil de restriction, amplifications par PCR.</p> <p><i>Les méthodes associées à ces principes seront vues lors des activités technologiques en biologie cellulaire et moléculaire.</i></p>
<p>2. Identification probabiliste Etude de caractères morphologiques et biochimiques.</p>	<p>On donnera les éléments permettant de comprendre l'utilisation des logiciels et des catalogues d'identification lors des activités technologiques en analyse microbiologique.</p>
<p>3. Systématique des groupes microbiens intéressant les bioindustries</p>	<p>Cette étude sera conduite lors des activités technologiques en analyse microbiologique.</p>

Module 5

Les flores utiles en microbiologie industrielle

Contenus	Commentaires
L'ensemble des applications de ce module sera étudié en relation étroite avec les activités technologiques en analyse microbiologique, notamment lors de l'opération unitaire « fermentation ».	
1. Etude des souches et des levains 1.1. Les bactéries lactiques, acétiques, les levures et les moisissures 1.2. Sélection des souches et des levains 1.3. Amélioration 1.4. Conservation des souches Différentes méthodes de conservation, problèmes liés à ces méthodes, choix de la méthode.	On étudiera leurs rôles dans l'élaboration et la transformation des aliments. On envisagera les conséquences de contaminations : bactériophages des bactéries lactiques, levures killer ... On envisagera la sélection des bactéries lactiques par l'étude de leur activité acidifiante et par leur production d'arômes. On abordera très succinctement les différentes méthodes d'amélioration des souches. On évoquera les méthodes de conservation sur gélose, de congélation en glycérol, de congélation sur billes, en azote liquide, de dessiccation, de lyophilisation.
2. Production des souches et des levains 2.1. Les étapes de la production - Revivification - Préculture - Contrôles de pureté, contrôle de stérilité des milieux de production - Production en fermenteur 2.2. Production de biomasse : suivi des principaux paramètres de la croissance 2.3. Conditions de croissance Facteurs physico-chimiques influençant le développement des souches : pH, température, oxygénation, fourniture de nutriments (fed batch ...), optimisation.	<i>Le cours de sciences et technologies bioindustrielles traitera de l'étude des composants du fermenteur, de son fonctionnement, des systèmes d'acquisition de données, des systèmes de contrôle et de régulation, des systèmes de traitement de données.</i> On s'intéressera au temps de génération, à la vitesse spécifique de croissance, à la vitesse spécifique de consommation de substrat, aux rendements.
3. Différents types de production de métabolites 3.1. Métabolites primaires : alcools, acides aminés et organiques, enzymes, vitamines, polyosides. 3.2. Métabolites secondaires : antibiotiques 3.3. Bioconversions 3.4. Production de vaccins	On présentera un exemple de chaque type de production (souches utilisées, voies de biosynthèse et leurs régulations, milieu(x) utilisé(s), mode(s) de récupération du produit).
4. Elaboration d'aliments, transformation	<i>Cette étude sera menée en cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i>

Module 6

Les agents d'altération de la qualité marchande et sanitaire des bioproduits

Contenus	Commentaires
<p>1. Origine des flores d'altération</p> <p>1.1. Flores d'origine exogène</p> <ul style="list-style-type: none"> - Flores saprophytes (eau, sol, air, surface, matériel) - Flores commensales et pathogènes de l'homme et des animaux <p>1.2. Flores d'origine endogène</p> <ul style="list-style-type: none"> - Flores commensales des animaux - Flores pathogènes des animaux - Flore résidente des végétaux 	<p>On développera la composition et les rôles des flores cutanée, oropharyngée et intestinale. On explicitera les notions de flores résidentes et transitoires et de porteurs asymptomatiques.</p> <p>On traitera, comme exemple, les bactéries pathogènes retrouvées dans le lait cru.</p>
<p>2. Flores d'altération de la qualité marchande</p> <p>2.1. Flore mésophile aérobie totale</p> <p>2.2. Flores bactériennes d'altération sélectionnées par les caractéristiques physico-chimiques du bioproduit</p> <p>2.3. Flores bactériennes d'altération liées au mode de fabrication et de conservation</p> <p>2.4. Flore fongique</p>	<p>On évoquera l'importance de la « chaîne du froid ».</p> <p>La flore mésophile aérobie totale sera envisagée comme un indice de la qualité du bioproduit. On traitera des flores lipolytique, caséolytique, lactique, acétique, xérophile, osmophile.</p> <p>On traitera les flores mésophiles protéolytiques (flore de putréfaction), psychrotrophes et thermorésistantes.</p> <p>On étudiera les rôles des levures et moisissures dans les phénomènes d'altération des bioproduits.</p>
<p>3. Flores indicatrices de l'altération de la qualité sanitaire</p> <p>3.1. Coliformes et coliformes thermotolérants</p> <p>3.2. <i>Escherichia coli</i></p> <p>3.3. <i>Enterobacteriaceae</i></p> <p>3.4. Streptocoques fécaux</p> <p>3.5. Spores de bactéries anaérobies sulfite réductrices et spores de <i>Clostridium</i> sulfite réducteurs</p>	
<p>4. Les bactéries pathogènes responsables de TIA(C)</p>	<p>On développera :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les origines des contaminations ; - les principaux aliments concernés ; - les mécanismes physiopathologiques et la symptomatologie des TIA (C). <p>On introduira les différentes stratégies développées par les bactéries et l'importance du terrain. On évoquera l'estimation quantitative du pouvoir pathogène des bactéries.</p> <p>On s'attachera à montrer la complexité de certaines pathogénités, alliant phénomènes invasifs et toxinogénèse.</p>

<p>4.1. Interaction bactérie-hôte : rôle du terrain</p> <p>4.2. Bactéries agissant principalement par leur pouvoir invasif</p> <p>4.2.1. Bactéries entéroinvasives <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques</p> <p>4.2.2. Autres bactéries <i>Listeria monocytogenes</i></p> <p>4.3. Bactéries agissant par la production d'une toxine</p> <p>4.3.1. Bactéries agissant par la sécrétion d'une entérotoxine <i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène</p> <p>4.3.2. Bactérie agissant par la sécrétion d'une neurotoxine <i>Clostridium botulinum</i></p> <p>4.4. Notions d'épidémiologie</p>	<p>Les défenses de l'organisme seront abordées sans faire l'objet d'une revue exhaustive. On définira l'infection localisée, régionale ou généralisée, et on insistera sur le cas des hôtes ayant un système immunitaire déficient.</p> <p>On utilisera les éléments du module 1 intervenant dans les processus d'adhésion et de résistance pour étudier :</p> <ul style="list-style-type: none"> - le franchissement des barrières cutanéomuqueuses ; - l'activité antiphagocytaire des bactéries. <p>La séquestration du fer et ses conséquences seront également envisagées.</p> <p>On définira les toxines. On présentera les classifications et les propriétés des toxines : pouvoir toxique, pouvoir antigénique, spécificité d'action.</p> <p>On définira et on donnera des exemples de : épidémie, pandémie, endémie, cas sporadique. On évoquera la surveillance des TIAC. On définira incidence et prévalence.</p>
<p>5. Les moisissures productrices de mycotoxines</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aflatoxines - Ochratoxines - Ergotamine - Patuline 	<p>On développera :</p> <ul style="list-style-type: none"> - les origines des contaminations par les moisissures ; - les principaux aliments concernés ; - les effets des principales mycotoxines.

6. Les algues productrices de toxines	On décrira les effets sur l'organisme de l'ingestion de coquillages et poissons parasités par des algues toxiques : PSP et DSP (phycotoxines paralysantes et diarrhéiques).
7. Les parasites 7.1. Helminthes Cestodes : <i>Taenia</i> Trématodes : <i>Fasciola hepatica</i> (Douve du foie) Nématodes : <i>Anisakis</i> , <i>Trichinella</i> 7.2. Protozoaires Toxoplasma gondii Entamoeba histolytica Giardia intestinalis	On se limitera à une présentation succincte de l'origine alimentaire, des moyens de prévention contre ces parasites, de l'aspect clinique des parasitoses.
<i>Les virus et leurs implications dans les infections alimentaires seront traités dans le cours de biologie cellulaire et moléculaire</i>	

Module 7

Prévention contre les biocontaminations et contrôles des bioproduits

Contenus	Commentaires
1. Prévention des biocontaminations 1.1. Conception et hygiène des locaux (surface et matériel, sol) nettoyage, désinfection 1.2. Etude de l'aérobiocontamination, salles à atmosphère contrôlée 1.3. Hygiène du personnel 1.4. Sélection et stockage des matières premières 1.5. Eaux de fabrication, de lavage, de rinçage 1.6. Conditionnement aseptique	<p><i>Cette étude sera conduite en relation avec la démarche HACCP développée dans le module « qualité » du cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i></p> <p>Les méthodes de contrôle seront appliquées lors des activités technologiques en analyse microbiologique.</p> <p><i>Cette étude sera menée en relation avec le cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i></p>
2. Contrôles des bioproduits 2.1. Les critères microbiologiques	On définira les différents types de critères : officiels, auto-critères.

<p>2.2. Les méthodes de contrôle</p> <ul style="list-style-type: none"> - Méthodes officielles - Méthodes normalisées : AFNOR, ISO... - Méthodes alternatives (rapides) - Validation AFNOR <p>2.3. Les niveaux de contrôle dans la fabrication</p> <p>2.4. Les étapes du contrôle</p> <ul style="list-style-type: none"> - Echantillonnage et plans d'échantillonnage - Prélèvements et préparation de l'échantillon pour analyse <p>2.5. Méthodes de quantification</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dénombrement direct des cellules (cytométrie, DEFT), - Dénombrement après culture - Evaluation de l'activité globale (impédancemétrie, ATP métrie) <p>2.6. Méthodes de recherche et d'identification</p> <ul style="list-style-type: none"> - Méthodes traditionnelles - Méthodes rapides (immunoenzymologie, sondes nucléiques, amplification génique). 	<p>On définira les notions de méthode de référence et méthode de routine.</p> <p>On explicitera les critères de choix de la méthode de contrôle.</p> <p>On différenciera méthode horizontale et méthode sectorielle.</p> <p>On traitera du contrôle des matières premières, des contrôles en cours de fabrication et contrôle du produit fini. <i>L'étude de ces différents niveaux sera réalisée en relation avec la démarche HACCP développée dans le module « qualité » du cours de sciences et technologies bioindustrielles.</i></p> <p>L'ensemble de ces méthodes sera appliqué lors des activités technologiques en analyse microbiologique.</p> <p><i>L'ensemble de ces méthodes sera appliqué lors des activités technologiques en analyse microbiologique.</i></p> <p><i>L'ensemble de ces méthodes sera appliqué lors des activités technologiques en biologie cellulaire et moléculaire.</i></p>
---	--

Activités technologiques en analyse microbiologique

Cet enseignement est dispensé dans un laboratoire réservé à la microbiologie, en groupe d'atelier dont l'effectif ne peut être supérieur à quinze.

Au cours de cette formation, les étudiants seront conduits à :

- préparer les appareils, les milieux de culture et les réactifs ;
- observer les microorganismes ;
- isoler et identifier les microorganismes ;
- maîtriser la culture des microorganismes, c'est-à-dire choisir les milieux de culture et réaliser des conditions convenables de culture ;
- quantifier les populations microbiennes ;
- évaluer l'efficacité des agents antimicrobiens ;
- effectuer, selon les normes en vigueur, les contrôles de la qualité sanitaire et marchande des bioproduits et les contrôles des environnements associés ;
- mener des opérations unitaires de fermentation et de stérilisation ou pasteurisation.

Ces différentes activités correspondent aux compétences C1. 2.

Les points correspondant aux compétences C2. 3, C2. 4, C4. 2, C4. 4, C5. 2 ne font pas l'objet d'une description détaillée, mais ils sont systématiquement abordés au cours des différentes manipulations proposées.

Le programme d'activités technologiques en analyse microbiologique permet de mettre en œuvre un grand nombre de méthodes. Cependant, lorsque cela est précisé, certaines méthodes pourront n'être abordées que de façon théorique. Les étudiants devront alors en connaître les principes, évaluer les risques spécifiques associés et être en mesure d'exploiter les résultats que ces méthodes permettent d'obtenir.

Le respect des règles relatives à la prévention de la santé et à la protection de l'environnement doit demeurer un souci constant et prioritaire lors de la mise en œuvre des activités technologiques en microbiologie, comme doit l'être la pratique de la démarche de prévention des risques professionnels.

L'outil informatique sera largement utilisé.

On sensibilisera les étudiants au coût des appareils, matériels et produits.

Module 1 Observations et culture des microorganismes

Contenus	Commentaires
1. Techniques microscopiques Etat frais et colorations	Observations et descriptions microscopiques de bactéries, levures, moisissures, algues et protozoaires. <ul style="list-style-type: none"> - Colorations usuelles : Gram, bleu de méthylène - Colorations spéciales des spores et des mycobactéries - Colorations fluorescentes.

<p>2. Techniques de culture</p> <p>2.1. Techniques d'ensemencement et d'isolement</p> <p>2.2. Préparation et contrôle de l'efficacité des milieux de culture</p> <p>2.3. Culture en aérobiose et sous différentes atmosphères</p>	<p>Observation et description microscopique de bactéries, levures et moisissures.</p> <p>Les constituants essentiels des principaux milieux utilisés en contrôle dans les bioindustries doivent être connus ainsi que leurs rôles.</p> <p>Le choix d'un milieu de culture en fonction de son utilisation doit être maîtrisé.</p> <p>On utilisera des milieux non sélectifs de base et enrichis et des milieux sélectifs choisis parmi ceux utilisés dans les bioindustries.</p> <p>Utilisation de souches de microorganismes de référence pour la validation des milieux de culture dans la démarche assurance qualité du laboratoire.</p> <p>Maîtrise des principaux procédés physico-chimiques permettant d'obtenir la culture des bactéries anaérobies strictes, microaérophiles, exigeantes en CO₂.</p>
<p>3. Techniques de conservation</p> <p>Bactéries et champignons microscopiques, souches de référence, souches industrielles et levains</p> <p>3.1. Repiquage</p> <p>3.2. Congélation</p> <p>3.3. Lyophilisation</p>	<p>Vérification de la conservation des caractères des souches et des levains.</p> <p>Etapas et procédés de congélation :</p> <ul style="list-style-type: none"> - utilisation de milieux de conservation (géloses, culots de gélatine ...), - congélation en congélateur, azote liquide, - utilisation de cryoprotecteurs, - vérification de la conservation des caractères des souches et des levains. <p>Revivification d'une souche congelée.</p> <p>La lyophilisation pourra n'être étudiée que de façon théorique.</p>

Module 2

Identification des microorganismes

Etude des caractères morphologiques, biochimiques et antigéniques dans le cas de souches à identifier, de souches de référence, du contrôle de qualité de levains.

L'identification (1) ou l'orientation (2) porteront sur des groupes microbiens intéressants dans les bioindustries : *Micrococcus* (1), *Staphylococcus* (1), *Streptococcus* (1), *Enterococcus* (1), *Lactococcus* (1), *Leuconostoc* (2), *Pediococcus* (2), *Enterobacteriaceae* (1), *Acinetobacter* (1), *Pseudomonas* et genres apparentés (1), *Vibrio* et genres apparentés (1), *Listeria* (1), *Bacillus* (1), *Lactobacillus* (1), *Clostridium* (1), *Mycobacterium* (2), *Streptomyces* (2), levures et moisissures d'intérêt industriel (1).

Contenus	Commentaires
1. Techniques microbiologiques classiques	Les méthodes utilisées devront tenir compte de la généralisation de techniques émergentes sans pour autant négliger les techniques traditionnelles (galeries biochimiques traditionnelles et miniaturisées).
2. Techniques immunologiques	Immunoagglutination, ELISA, immunofluorescence, immunocapture... <i>Ces techniques seront mises en oeuvre en relation avec les activités technologiques en biologie moléculaire et cellulaire.</i>
3. Techniques de biologie moléculaire	Utilisation de sondes froides, PCR... <i>Ces techniques seront mises en oeuvre en relation avec les activités technologiques en analyse biochimique.</i>

Module 3

Quantification et suivi de croissance

Contenus	Commentaires
1. Techniques de quantification des microorganismes	On étudiera les causes d'erreur, les conditions de reproductibilité ainsi que la variabilité analytique des résultats obtenus avec les différentes techniques appliquées à la quantification des bactéries, moisissures, levures et virus.
1.1. Mesure du nombre	
1.1.1. Comptage microscopique	Comptage en cellule, méthode de Breed, épifluorescence (DEFT).
1.1.2. Comptage automatique	Compteur de particules, cytométrie en flux, impédancemétrie ; ces techniques pourront n'être étudiées que de façon théorique.
1.1.3. Dénombrement après culture	Dénombrement en milieu liquide, en milieu solide, sur membrane.
1.2. Mesure de la biomasse	Opacimétrie, méthode pondérale.
1.3. Mesure de l'activité	Consommation de substrat, apparition d'un produit du métabolisme. Les mesures de consommation de substrat et d'apparition d'un produit du métabolisme seront réalisées lors de l'opération unitaire « fermentation ». ATPmétrie ; cette technique pourra n'être étudiée que de façon théorique.

<p>2. Etude du suivi de croissance en milieu non renouvelé</p> <p>2.1. Suivi de la production de biomasse</p> <p>2.2. Etude de la croissance en présence d'un agent antimicrobien</p> <p>2.3. Etude de la croissance en présence de vitamines</p> <p>2.4. Etude de la croissance lors de l'infection phagique de levains</p>	<p>Etablissement de courbes de croissance. Détermination des différents paramètres cinétiques.</p> <p>Etude de l'influence des différents facteurs physico-chimiques : pH, température, oxygénation, fourniture en substrat.</p> <p>Détermination de la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀).</p> <p>Dosage microbiologique de vitamines.</p> <p>On réalisera un dénombrement des bactériophages par la méthode des plages de lyse, on constituera une suspension stock de phages.</p>
---	---

Module 4

Etudes relatives aux agents antimicrobiens

Contenus	Commentaires
<p>Les aspects thérapeutiques de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne seront pas abordés. Les exemples seront choisis dans des contextes intéressant les bioindustries.</p>	
<p>1. Etude de la sensibilité des souches aux agents antimicrobiens</p>	<p>Détermination de la CMI par les méthodes en milieu liquide et en milieu solide. Antibiogramme par la méthode des disques</p>
<p>2. Recherche et dosage d'un agent antimicrobien dans un bioproduit</p>	<p>Méthodes des puits et des disques</p>
<p>3. Contrôle de l'efficacité d'un conservateur</p>	<p>Mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque (PII) Test de résistance à la contamination bactérienne et fongique : "challenge test" Test de mesure du temps de réduction décimale</p>
<p>4. Détermination de l'activité bactéricide d'un antiseptique et/ou d'un désinfectant</p>	<p>Selon les normes en vigueur :</p> <ul style="list-style-type: none"> - méthode de dilution-neutralisation ; - méthode de filtration sur membrane.
<p>5. Evaluation de l'activité bactéricide de radiations UV</p>	<p>Evaluation des doses létales. Travail statistique sur une population.</p>

Module 5

Contrôles microbiologiques

Contenus	Commentaires
<p>1. Contrôles de la qualité microbiologique des bioproduits</p> <p>1.1. Aliments :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eau d'alimentation - Laits et produits laitiers - Viandes - Conserves - Produits de la mer - Plats cuisinés <p>1.2. Produits cosmétiques</p> <p>1.3. Médicaments</p>	<p>Les différentes analyses respecteront les normes ou textes réglementaires en vigueur et comprendront :</p> <ul style="list-style-type: none"> - échantillonnage et préparation des échantillons pour essais ; - dénombrement des flores d'altération de la qualité marchande ; - dénombrement des flores indicatrices de la qualité sanitaire ; - recherche (et/ou dénombrement) et identification des bactéries pathogènes ; - validation des résultats. <p>Le contrôle des aliments portera sur des produits choisis pour la diversité des étapes de leur analyse et des techniques utilisées.</p> <p>Toutes les techniques ne sont pas à mettre en œuvre pour tous les produits. Il faudra toutefois s'assurer qu'au cours de l'enseignement l'ensemble des techniques d'analyse des aliments et des produits cosmétiques, sans exclure les méthodes rapides, seront mises en application.</p>
<p>2. Contrôles de stérilité</p> <ul style="list-style-type: none"> - Des matériels - Des milieux de culture - Des produits pharmaceutiques (matériel, certains médicaments) 	<p>On choisira une application pratique qui sera réalisée selon les normes ou textes réglementaires existants.</p> <p>Recherche de substances pyrogènes (détection des endotoxines par le test <i>Limulus chromogénique</i>)</p>
<p>3. Contrôles de pollution des locaux et contrôle de l'hygiène du personnel</p> <p>3.1. Surfaces et matériels</p> <p>3.2. Atmosphères</p> <p>3.3. Hygiène du personnel</p>	<p>Techniques classiques, techniques rapides</p> <p>Méthode statique, méthode dynamique</p> <p>Désinfection d'ambiance des locaux (présentation théorique)</p> <p>Contrôle de l'hygiène des mains</p> <p>Mise en évidence des microorganismes de la flore cutanée, des poils et des cheveux</p> <p>Recherche de porteurs sains de <i>Staphylococcus aureus</i></p>

Module 6

Opérations unitaires de microbiologie

Contenus	Commentaires
<p>1. Réalisation d'une production en fermenteur pilote</p>	<p>Il s'agira de mettre en œuvre l'ensemble des opérations indispensables à la production :</p> <ul style="list-style-type: none"> - vérification de la pureté de la souche productrice ; - vérification de ses caractères intéressant la production ; - préparation des milieux de culture, stérilisation et vérification de leur stérilité, - réalisation de la préculture ; - ensemencement du fermenteur ; - conduite de la fermentation avec réglage des points de consigne ; - suivi de la production par enregistrement et traitement des données intervenant dans la régulation ; - récupération, caractérisation et /ou dosage du produit formé ; - arrêt de la fermentation et désinfection ou stérilisation du milieu de production avant élimination.
<p>2. Réalisation d'une pasteurisation (ou stérilisation)</p>	<p>On mettra en œuvre une opération de pasteurisation dans le domaine alimentaire ou une opération de stérilisation dans le domaine pharmaceutique ou alimentaire. La préparation des appareillages et des matériels, leur nettoyage devront être maîtrisés. On étudiera l'influence et l'optimisation des paramètres et on effectuera les contrôles nécessaires.</p> <p>On déterminera la valeur pasteurisatrice et/ou stérilisatrice et l'efficacité pasteurisatrice.</p> <p>Au préalable, on étudiera la destruction thermique des bactéries, on déterminera le temps de réduction décimale D_T et le facteur d'inactivation thermique Z.</p> <p>On établira le barème de pasteurisation.</p>