

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**1<sup>er</sup> JOUR**

**Durée de l'épreuve : 3 H**

**Épreuve E5 - Unité U52**

**Techniques de microbiologie**

**Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.**

**Pour une bonne réalisation de l'épreuve, une gestion optimale du temps imparti est nécessaire en fonction des temps d'incubation. Le candidat prendra soin de bien lire l'ensemble du sujet avant de commencer les manipulations.**

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

**ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**  
**Techniques de microbiologie**  
**1<sup>ER</sup> JOUR**

**CONTRÔLE AU COURS D'UNE PRODUCTION EN**  
**FERMENTEUR**

Une protéine d'intérêt est produite par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* transformée. La souche productrice est conservée par congélation à - 20°C en présence de glycérol. L'ensemencement de la cuve de production est réalisé à partir d'une pré-culture obtenue en plusieurs étapes.

**1 - Contrôle de pureté, stabilité et viabilité de la souche de levure. (26 points)**

**1.1 - Matériel :**

- 1 tube contenant une suspension décongelée de la souche notée « S ».
- un isolement sur gélose Sabouraud en boîte de la souche S notée « Sab ».
- un hématimètre de Malassez.
- 1 tube contenant 1 mL de bleu de Funk (bleu de méthylène tamponné à pH 4).
- 3 pipettes stériles de 1 mL.
- 1 tube à hémolyse stérile.
- 1 tube de 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 1 gélose Sabouraud coulée en boîte de Pétri.
- 1 API 20 C AUX + ampoule API AUX Médium.
- Bleu de méthylène.
- 1 tube à hémolyse de 2 mL d'eau physiologique stérile.
- 1 fiche technique cellule de Malassez.
- 1 fiche technique Jour 1 et Jour 2 API 20 C AUX (à laisser en fin d'épreuve).

**1.2 - Contrôle de viabilité.**

Le test de viabilité est réalisé sur la suspension de levure décongelée « S », en cellule de Malassez, en présence de bleu de Funk.

Le bleu de Funk colore en bleu très foncé les cellules mortes. Les cellules vivantes sont peu ou pas colorées.

Le pourcentage de viabilité doit être supérieur ou égal à 80 %.

Effectuer la dilution  $10^{-1}$  de la suspension « S ».

Introduire dans un tube à hémolyse stérile 0,5 mL de la dilution précédente et 0,5 mL de bleu de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez.

Expliquer, à l'aide d'un schéma, la technique de comptage des cellules dans un rectangle.

Quelle autre unité de comptage peut être utilisée ? Justifier son intérêt.

Effectuer le dénombrement.

Déterminer le pourcentage de viabilité. Conclure.

**Montrer à un examinateur la mise en cellule de Malassez  
et un champ microscopique accompagné du comptage associé.**

**1.3 - Contrôle de la pureté microbiologique et de la stabilité des caractères d'identification de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*.**

La vérification de la pureté et des caractères biochimiques de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* décongelée est effectuée à partir d'un isolement de 24 heures sur gélose Sabouraud notée « Sab ».

Contrôler :

- les caractères morphologiques de la souche,
- la pureté par un isolement sur gélose Sabouraud en boîte de Pétri,
- les caractères biochimiques par ensemencement d'une galerie API 20 C AUX.

**Présenter l'examen microscopique réalisé  
accompagné du compte rendu de l'observation.**

**2 - Contrôle des paramètres cinétiques de la souche de levure. (26 points)**

Un fermenteur 10 L a étéensemencé par la souche de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu « M ». On souhaite déterminer la vitesse spécifique de croissance de cette souche afin de vérifier sa productivité.

**2.1 - Matériel :**

- un prélèvement en tube noté « P ».
- 4 semi-microcuvettes pour spectrophotomètre.
- parafilm.
- 1 flacon de 20 mL de milieu de culture « M ».
- 7 tubes de 9 mL de tryptone-sel stérile.
- 8 pipettes stériles de 1 mL.
- 6 géloses OGA coulées en boîte de pétri (Oxytétracycline Glucose Agar).
- 1 flacon contenant des billes stériles + pot de récupération avec javel.

**2.2 - Détermination de la vitesse spécifique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Au temps  $t_0$ , l'inoculum bactérien introduit dans le fermenteur était d'environ  $3 \cdot 10^5$  levures/mL. Le prélèvement « P » a été effectué après 4 heures d'incubation.

**Remarque :**

Dans les conditions de l'expérience, on considère que la phase de latence est négligeable.

Mesurer la densité optique à 620 nm du prélèvement « P » afin d'évaluer sa concentration en tenant compte de la relation donnée en début d'épreuve par les examinateurs.

**Appeler un examinateur pour la mesure spectrophotométrique.**

A partir du prélèvement « P », réaliser le dénombrement en surface en encadrant la dilution comptable (3 dilutions en double exemplaire).

**Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.**

Incuber à 30°C.

Justifier sur le compte rendu le choix des dilutions testées, du milieu OGA et de la technique d'ensemencement en surface.

**3 - Élimination d'un contaminant bactérien. (28 points)**

La culture en bioréacteur est régulièrement contaminée par une souche de *Staphylococcus aureus*. Afin de lutter contre ce contaminant, il a été décidé d'ajouter un antibiotique efficace dans le milieu de culture. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ampicilline vis-à-vis de cette souche est ainsi déterminée pour optimiser le traitement.

**3.1 - Matériel :**

- 1 tube de bouillon Mueller-Hinton de 18 heures de *Staphylococcus aureus* noté « S. aureus ».
- 4 tubes de 9 mL de bouillon Mueller-Hinton.
- 8 pipettes stériles de 1 mL.
- 1 tube contenant 4 mL de solution d'ampicilline à  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  noté « Amp ».
- 8 tubes à hémolyse vides et stériles.
- 1 flacon contenant 20 mL de bouillon Mueller-Hinton.

**3.2 - Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.**

Diluer une culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* en bouillon Mueller-Hinton afin de réaliser un inoculum de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

On rappelle que la densité d'une culture de 18 heures de *Staphylococcus aureus* est d'environ  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

A partir d'une solution d'ampicilline à  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , réaliser 8 dilutions successives de raison 1/2 de l'antibiotique en bouillon Mueller-Hinton (volume final : 1 mL).

Ajouter 1 mL de l'inoculum réalisé à chaque dilution d'ampicilline et réaliser un témoin pour valider la méthode.

Incuber la gamme et le témoin à 37°C.

**3.3 - Compte rendu.**

Justifier la concentration de l'inoculum utilisé. Expliquer sa préparation.

Présenter sous forme de tableau la gamme de dilutions de l'antibiotique en précisant les volumes de solution mère d'ampicilline, de diluant et de suspension bactérienne.

Les concentrations finales d'ampicilline pour chaque tube seront indiquées.

Justifier le rôle et la réalisation du tube témoin.