



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Campagne 2009

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

BTS MÉTIERS DE L'EAU

BIOCHIMIE BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX – U. 4

SESSION 2009

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage de la calculatrice est interdit.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.

Le sujet comporte 11 pages, numérotées de 1/11 à 11/11.

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2009
Biochimie biologie et microbiologie des eaux – U. 4	MTBBM	Page : 1/11

ALTÉRATIONS DE LA QUALITÉ DE L'EAU DANS UN RÉSEAU D'EAU INDUSTRIELLE

Un site industriel utilise un circuit d'eau refroidie par tours aéro-réfrigérantes (TAR) pour son process de fabrication de roulements à billes.

Il rencontre de façon récurrente des problèmes de prolifération bactérienne et de corrosion dans son réseau d'eau industrielle.

Dernièrement, le site dût cesser temporairement son activité suite à la présence de légionnelles dans ce même réseau.

Il a donc demandé les conseils d'un bureau d'études pour résoudre ces problèmes.

1. PROLIFÉRATION BACTÉRIENNE (12 points)

Des inspections télévisuelles des conduites ont permis de mettre en évidence des nodules de corrosion en divers points du réseau. L'étude de ces nodules a montré la présence de grandes quantités d'hydroxyde ferrique associé à un film bactérien.

1.1 **Citer** les étapes de la colonisation d'un réseau d'eau par un biofilm.

1.2 **Citer** les différents types d'organismes constituant le biofilm.

1.3 **Schématiser** la dynamique du biofilm dans une canalisation.

Préciser les facteurs agissant de façon favorable et défavorable sur l'évolution du biofilm.

1.4 **Indiquer** la conséquence de la prolifération de la biomasse sur la qualité microbiologique de l'eau de refroidissement.

2. CORROSION (34 points)

L'étude microbiologique des populations bactériennes des nodules de corrosion a permis de mettre en évidence au moins deux types de populations bactériennes :

- *bactéries chimiolithoautotrophes aérobies strictes ;*
- *bactéries chimioorganohétérotrophes anaérobies strictes.*

2.1 **Définir** les termes « chimiolithoautotrophes » et « chimioorganohétérotrophes ».

2.2 **Définir** les termes « aérobie stricte » et « anaérobie stricte ».

Décrire la mise en évidence, au laboratoire, de ces deux types respiratoires (milieu utilisé, conditions d'utilisation, résultats obtenus).

Les bactéries chimiolithoautotrophes aérobies strictes ont été identifiées comme étant des ferrobactéries.

Le fer est oxydé au contact d'une chaîne de transporteurs d'électrons :

- *les électrons arrachés au fer transitent jusqu'à un accepteur final : l'oxygène ;*
- *une translocation de protons est générée lors de ce transport ;*
- *le gradient de protons permet le fonctionnement de l'ATP synthétase.*

2.3 À partir des données précédentes, **schématiser** le processus d'utilisation du fer par ces bactéries.

2.4 **Justifier** leur type respiratoire.

Les bactéries chimioorganohétérotrophes anaérobies strictes ont été identifiées comme appartenant aux bactéries fermentatives et sulfatoréductrices.

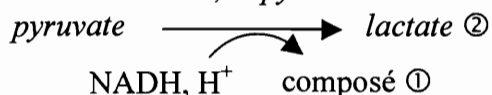
Les bactéries fermentatives tirent leur énergie de l'oxydation de matières organiques comme le glucose et produisent de la matière organique peu dégradée.

2.5 **Citer** la famille à laquelle appartient le glucose et **indiquer** les fonctions chimiques caractéristiques de cette famille.

Les bactéries fermentatives dégradent le glucose selon la voie métabolique présentée en annexe 1 (page 5/11).

2.6 **Reporter** sur la copie la signification des légendes A à L (**annexe 1**).
Donner le bilan énergétique global de cette voie.

En anaérobiose, le pyruvate est réduit selon la réaction suivante :



2.7 **Écrire** sur la copie les formules ou noms des composés $\textcircled{1}$ et $\textcircled{2}$.
Donner l'utilité de cette réaction pour ces bactéries.

2.8 **Calculer** la variation d'enthalpie libre standard de cette réaction en kJ moles^{-1} .
Conclure.

Données :

- $\Delta G'_o = -n.F.\Delta E'_o$ en J/mol^{-1} ;
- $n = \text{nombre d'électrons échangés lors de la réaction} = 2$;
- $F = 96500 \text{ J. moles}^{-1} \text{ V}^{-1}$;
- $E'_o \text{ couple pyruvate / lactate} = -0,190 \text{ V}$;
- $E'_o \text{ NAD}^+ / \text{NADH, H}^+ = -0,320 \text{ V}$.

Les bactéries sulfatoréductrices sont principalement représentées par les bactéries du genre *Desulfovibrio*. Quelques caractéristiques typiques sont présentées en annexe 2 (page 6/11).
Les bactéries du genre *Desulfovibrio* font entrer dans leur cellule les ions sulfates grâce à un transport actif membranaire H^+ / sulfates de type symport.

2.9 **Représenter** le symport des ions sulfates sous forme d'un schéma légendé.

Le schéma de l'annexe 3 (page 6/11) représente l'ensemble du phénomène de biocorrosion.

2.10 **Reporter** sur la copie la signification des légendes 1 à 4.

3. PRÉSENCE DE LÉGIONELLES (34 points)

De nombreux prélèvements réalisés au niveau de la tour aéro-réfrigérante se sont révélés être positifs à *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*).
Les caractéristiques de cette bactérie sont présentées en annexe 4 (page 7/11).

3.1 **Citer** le nom de la pathologie humaine causée par *L. pneumophila*.
Préciser le mode de transmission à l'homme.
Préciser la cible de la pathologie.

3.2 **Donner** le principe des étapes de la coloration de Gram.
Donner le résultat dans le cas de cette bactérie ; **justifier** au regard de la coloration.

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2009
Biochimie biologie et microbiologie des eaux – U. 4	MTBBM	Page : 3/11

3.3 **Qualifier** le comportement de *L. pneumophila* vis à vis de la température.

3.4 **Représenter**, sous forme d'un graphique, les effets de la température sur la croissance de cette bactérie.

Expliquer les principales phases de ce graphique.

3.5 **Définir** le terme auxotrophe.

Citer l'élément indispensable à la croissance des légionelles.

La recherche et le dénombrement de Legionella et L. pneumophila ont été réalisés selon la norme NF T 90-431. Un extrait de cette norme est présenté en annexe 5 (pages 8, 9 et 10/11).

3.6 Représenter, sous forme d'un schéma précis, le mode opératoire permettant de réaliser le dénombrement de *Legionella* et *L. pneumophila* **par la méthode directe uniquement**.

Les résultats obtenus pour la recherche et le dénombrement de Legionella dans l'eau du réseau des TAR sont les suivants :

- amont TAR : nombre de *Legionella* : $< 50 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$;

- aval TAR : nombre de *Legionella* : $2 \cdot 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.7 **Interpréter** ces résultats. **Conclure**.

3.8 **Citer** quatre facteurs favorisant la présence des légionelles dans le réseau d'eau des TAR.

Afin d'éradiquer le problème des légionelles, le bureau d'étude souhaite expérimenter un procédé de chloration choc du réseau d'eau des TAR dont les résultats sont présentés en annexe 6 (page 11/11).

3.9 **Expliquer** l'action du chlore sur les organismes vivants et **présenter** la forme chimique du chlore dans l'eau la plus efficace en désinfection.

3.10 **Interpréter** le graphique obtenu.

Le seuil acceptable de biomasse quantifiée dans le réseau doit être inférieur ou égale à 10^3 UFC L^{-1} .

Rappel : $\log_{10}^n = n$.

3.11 **Conclure** quant au taux de traitement en chlore à introduire dans le réseau pour respecter le seuil acceptable.

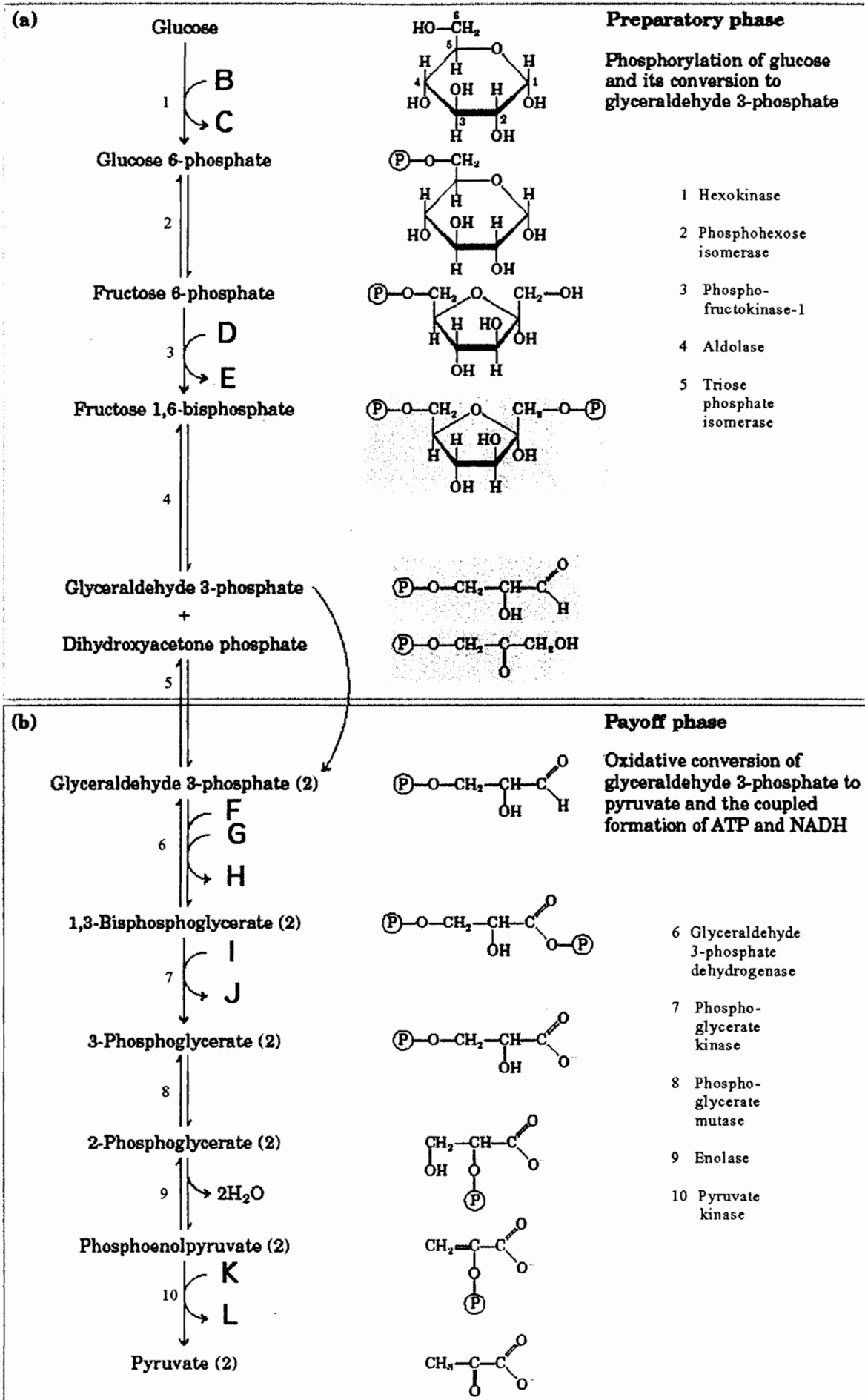
Une fois le taux optimal choisi, le bureau étudie la fréquence de chloration choc.

Les résultats d'une étude sont présentés en annexe 7 (page 11/11).

3.12 **Commenter et interpréter soigneusement** la courbe.

Déterminer en jours l'intervalle idéal entre deux chlорations pour assurer un bon état microbiologique du réseau.

ANNEXE 1 : NOM DE LA VOIE MÉTABOLIQUE [A]



Nom de la voie métabolique : "A" à préciser sur la copie.

ANNEXE 2 : CARACTÉRISTIQUES DU GENRE *Desulfovibrio*

Caractères bactériologiques

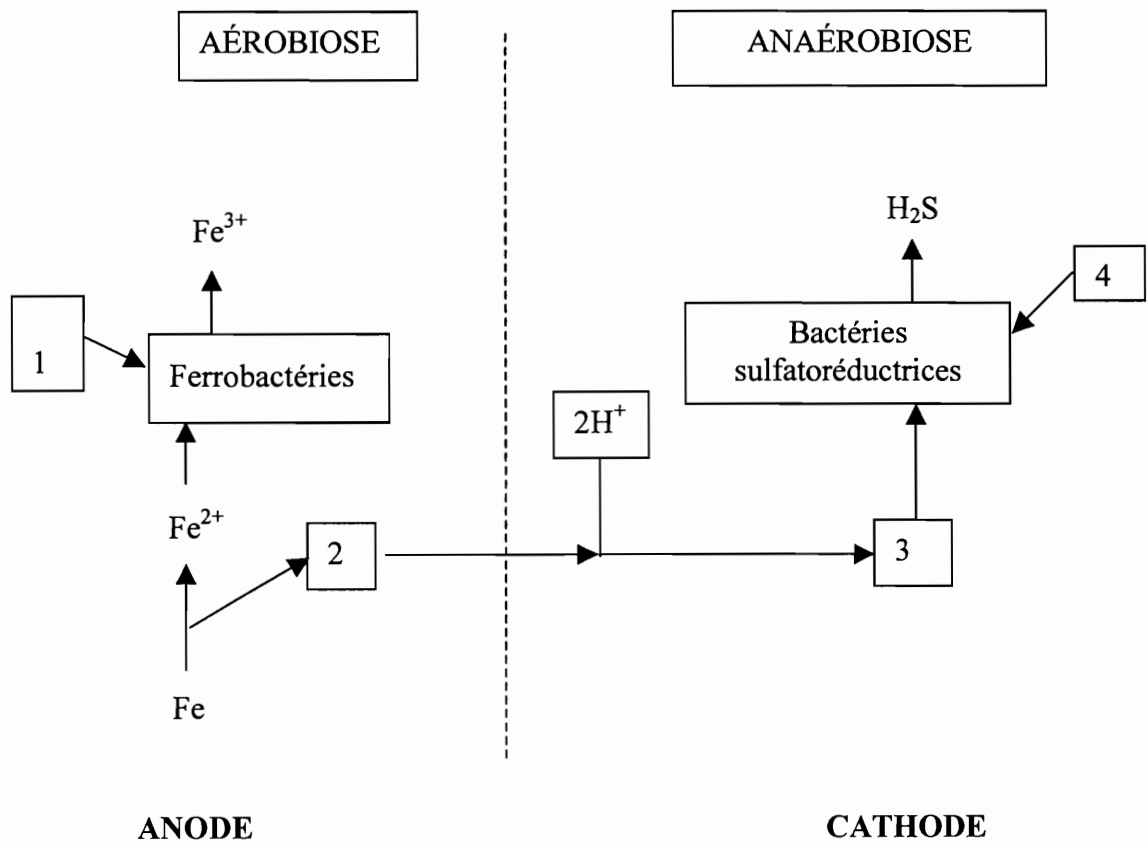
Le genre *Desulfovibrio* est constitué de bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés de 0,5 à 1,5 μm de largeur sur 2,5 à 10,0 μm de longueur, non sporulés, mobiles.

Anaérobies, à métabolisme généralement respiratoire (respiration anaérobie), utilisant les sulfates ou d'autres composés soufrés comme accepteurs finaux d'électrons.

Habitat

L'habitat des *Desulfovibrio* spp. est constitué par les sédiments ou les boues, l'environnement marin et l'intestin de l'homme et des animaux.

ANNEXE 3 : SCHÉMATISATION DE LA BIOCORROSION



ANNEXE 4 : CARACTÉRISTIQUES DES LÉGIONELLES

1- DESCRIPTIF

- Bacille à Gram négatif.
- Plus de 45 espèces de *Legionella* et 64 sérogroupes.

Principale espèce pathogène chez l'homme : *L. pneumophila* (séro groupe 1 (≈ 80 %), 6 (≈ 10 %), rarement 2 à 5).

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif mobiles aérobies strictes, catalase faiblement positive. Leur paroi a la particularité de contenir des acides gras ramifiés insaturés. Ces bactéries sont particulièrement exigeantes et ne peuvent cultiver que sur milieux spéciaux contenant de la cystéine.

2- ENVIRONNEMENT

Légionelles présentes en faibles concentrations dans les milieux hydro-telluriques naturels (notamment eaux stagnantes).

Prolifération possible de la bactérie dans les réseaux d'eau chaude sanitaire (établissement de santé, hôtel, camping, établissements de natation ou de sport...), l'eau des tours aéro-réfrigérantes, les eaux pour balnéothérapie...

3- VIABILITÉ

- Température optimale de croissance : 25 °C à 37 °C, capables de se multiplier jusqu'à 43 °C.
- Croissance favorisée par la stagnation des eaux, la présence de résidus métalliques, d'une microflore et de protozoaires (développement à l'intérieur des amibes libres), de dépôts de tartre, de certains matériaux.
- En fonction des températures, la durée nécessaire pour diminuer d'un facteur 10 la concentration des légionelles planctoniques, non adhérentes à une surface, est de l'ordre de 20 mn à 55 °C, 2 mn à 60 °C.
- Constamment sensible à des concentrations élevées de chlore (> 1 mg.L⁻¹).
- Mais présence à de faibles concentrations dans les circuits d'eau traitée par le chlore.

4- TRANSMISSION

Principalement inhalation d'un aérosol de fines gouttelettes (< 5 µm) émises par une installation technique comprenant un circuit d'eau chaude ou réchauffée colonisé par des souches pathogènes de *Legionella* à un niveau suffisant de concentration.

5- CONCENTRATION EN LÉGIONELLES

- À partir de 10³ UFC.L⁻¹, renforcement des mesures d'entretien et de contrôle et mise en œuvre des mesures nécessaires pour avoir < 10³ UFC.L⁻¹.
- À partir de 10⁴ UFC.L⁻¹, interdiction des usages à risque et moyens curatifs immédiats.
- À partir de 10⁵ UFC.L⁻¹, arrêt de l'installation pour vidange, nettoyage et désinfection.

ANNEXE 5 : RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE *Legionella* et *Legionella pneumophila* – méthode générale par ensemencement direct et filtration sur membrane – norme NF T 90-431

1- Domaine d'application

Cette méthode, faisant appel à un milieu sélectif, peut être appliquée à tous les types d'eaux : eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux industrielles, eaux naturelles, eaux thermales...

2- Définitions

Legionella : bacille gram-, incapable de croître sans L-cystéine sur gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure en 72 h à 37 °C.

Legionella pneumophila : *Legionella* donnant une réponse positive en immunofluorescence en présence d'un sérum anti-*L. pneumophila*.

3- Principe

- Ensemencement direct de l'échantillon sur milieu sélectif et en parallèle, filtration sur membrane en polycarbonate (diamètre des pores : 0,45 ou 0,22 µm), avec remise en suspension, soit par grattage, soit par ultrasons.
- Décontamination du concentré obtenu, d'une part, par traitement thermique, d'autre part, par traitement acide.
- Ensemencement du concentré avant et après décontamination, sur milieu sélectif.
- Incubation pendant 3 à 10 jours à 37 °C ± 1 °C.
- Repiquage des colonies typiques pour la mise en évidence des *Legionella*, exigeantes en L-cystéine.
- Essai sérologique des colonies de *Legionella* pour la recherche des *Legionella pneumophila* à l'aide d'immunosérums spécifiques.

4- Mode opératoire

4-1 Ensemencement

4-1-1 Méthode directe : ensemencer 0,2 mL d'eau à analyser et 0,2 mL de la dilution au 1/10^{ème} en PBS sur une boîte de Pétri contenant le milieu GVPC + antibiotiques.

4-1-2 Méthode indirecte : filtrer 1L d'eau à analyser sur une membrane en polycarbonate puis :

- soit gratter la membrane dans 5 mL d'eau à analyser et ensemencer 0,1 mL de ce concentré sur une boîte de milieu GVPC + antibiotiques ;
- soit placer au milieu d'une cuve à ultrasons un récipient contenant la membrane en polycarbonate immergé dans 5 ml d'eau à analyser pendant un temps compris entre 3 et 10 minutes et ensemencer 0,1 mL de ce concentré sur une boîte de milieu GVPC + antibiotiques.

Traiter une partie de l'échantillon concentré restant par traitement thermique, et une autre par traitement acide :

- traitement thermique : porter 2 mL stérile et placer ce tube dans un bain thermostaté à 50 °C ± 1 °C pendant 30 min ± 1min ;
- ensemencer immédiatement une boîte de milieu GVPC + antibiotiques avec 0,1 mL d'échantillon traité par la chaleur ;

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2009
Biochimie biologie et microbiologie des eaux – U. 4	MTBBM	Page : 8/11

- traitement acide : porter 2 mL d'échantillon concentré dans un tube et centrifuger à 60 000 m.s⁻² pendant 10 min ± 1min ;
enlever 1 mL de surnageant avec une pipette stérile et agiter vigoureusement ; ajouter 1 mL de tampon acide et agiter doucement ; laisser en contact 5 min ± 0,5 min ;
ensemencer immédiatement une boîte de milieu GVPC + antibiotiques avec 0,1 mL d'échantillon traité par l'acide.

4-2 Incubation (méthode directe et indirecte)

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve à 37 °C ± 1 °C durant 10 jours. Examiner les boîtes après 3, 5 et 10 jours d'incubation.

4-3 Dénombrement des *Legionella* (méthode directe et indirecte)

Sont considérées comme caractéristiques, les colonies qui présentent, après incubation à 37 °C, une coloration générale bleu-gris pouvant devenir blanchâtre en vieillissant, un bord bien net et rosé, et un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire.

Conserver les boîtes présentant de 1 à 50 colonies caractéristiques.

N étant le nombre de colonies caractéristiques, repiquer en vue d'une identification biochimique et sérologique :

- toutes les colonies si $1 < N \leq 5$;
- 5 à 7 colonies si $5 < N \leq 50$.

Confirmation

Repiquer les colonies suspectes sur :

- gélose BCYE α sans L-cystéine,
- gélose au sang,
- gélose BCYE α avec L-cystéine.

Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 3 jours et examiner les boîtes dès la fin de la période d'incubation.

La présence de culture sur gélose au sang et/ou gélose BCYE α sans cystéine infirme la présence de *Legionella*.

Compter comme *Legionella* toutes les colonies gram-, ne se développant que sur milieu BCYE α et présentant un aspect granuleux et une coloration générale bleu-gris pouvant devenir blanchâtre en vieillissant.

4-4 Dénombrement des *Legionella pneumophila* (méthode directe et indirecte)

Sont considérées comme *L. pneumophila*, les colonies précédentes qui présentent une réaction positive en immunofluorescence en présence d'un sérum anti-*L. pneumophila*.

5- Expression des résultats

Par convention, chaque colonie est considérée comme ayant été engendrée par un microorganisme.

Considéré d'abord les boîtes ayant étéensemencées en direct (4-1-1).

Si l'une des boîtes fournit un nombre exploitable ($n > 4$) de colonies confirmées, calculer le résultat en divisant le nombre de colonies confirmées par le volumeensemencé de la boîte exploitable exprimé en litres.

Exprimer le résultat de la façon suivante :

nombre de *Legionella*..... / litre dont *L. pneumophila*...../ litre.

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2009
Biochimie biologie et microbiologie des eaux – U. 4	MTBBM	Page : 9/11

Si les deux boîtes (4-1-1) donnent des nombres exploitables ($4 < n < 100$) de colonies confirmées, faire la somme des colonies apparues sur les boîtes lisibles et diviser par le volume total ensemencé dans ces mêmes boîtes et ramener à un litre.

Si les deux boîtes (4-1-1) sont inexploitables, examiner les boîtes ensemencées après concentration (4-1-2). Parmi les trois séries de boîtes (sans traitement, après traitement thermique et après traitement acide), choisir celle qui conduit au résultat le plus élevé. Exprimer ce résultat comme ci-dessus.

Si les boîtes ensemencées à partir du concentré (4-1-2) ne fournissent pas de colonies confirmées, mais qu'il en existe un petit nombre ($n < 5$) sur l'une des boîtes ensemencées en direct (4-1-1), exprimer alors le résultat sous la forme suivante :

nombre de *Legionella*.....< 50 / litre dont *L. pneumophila*.....< 50 / litre avec le commentaire suivant : « présence de quelques colonies de *Legionella* ou *L. pneumophila* en nombre non significatif ».

6- Milieux de culture

6-1 Milieu de base pour BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract α -ketoglutarate)

Extrait de levure	10 à 12 g
Charbon activé.....	1,5 à 2 g
Tampon ACES.....	5 à 10 g
α -cétoglutarate.....	1 g
KOH 1 mol/L	40 mL
Agar	12 à 17 g
Eau distillée.....	qsp 1000 mL

6-2 Milieu BCYE α sans L-cystéine

Milieu de base pour BCYE α	995 mL
Solution de pyrophosphate ferrique.....	5 mL

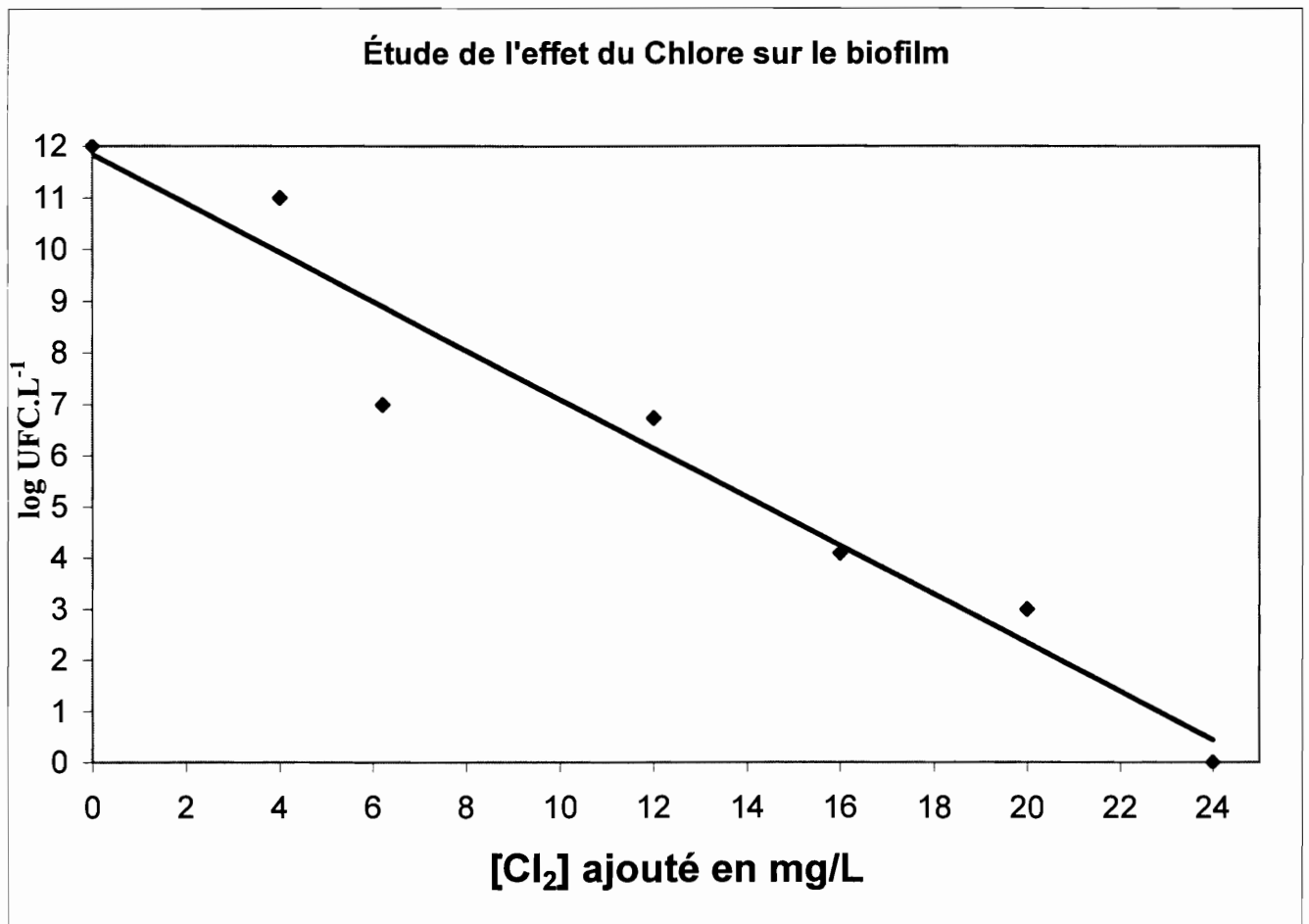
6-3 Milieu BCYE α sans antibiotiques

Milieu de base pour BCYE α	990 mL
Solution de pyrophosphate ferrique.....	5 mL
Solution de L-Cystéine.....	5 mL

6-4 Milieu complet GVPC avec antibiotiques

Milieu de base pour BCYE α	980 mL
Solution de L-cystéine.....	5 mL
Solution de pyrophosphate ferrique.....	5 mL
Solution d'antibiotiques et glycine.....	10 mL

ANNEXE 6 : ESSAIS DE CHLORATION EN AMONT DES TAR



ANNEXE 7 : DÉTERMINATION DE LA FRÉQUENCE IDÉALE DES CHLORATIONS

