



**LE RÉSEAU DE CRÉATION  
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Canopé de l'académie de Bordeaux  
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

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

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

## ÉPREUVE E5 – UNITÉ U52 TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

**1<sup>ER</sup> JOUR**

SESSION 2011

Durée : 3 heures 30  
Coefficient : 4

**Matériels autorisés :**

- Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)

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

**Attention : le protocole du premier jour ne pourra être réutilisé le second jour.**

**Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.  
Le sujet se compose de 10 pages, numérotées de 1/10 à 10/10.**

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2011
Nom de l'épreuve : Techniques de microbiologie - 1 <sup>er</sup> jour	Code : BAE5TM/1 Page : 1/10

# SUIVI D'UNE PRODUCTION DE VITAMINE B12 EN BIORÉACTEUR PAR DOSAGE MICROBIOLOGIQUE

## Contexte professionnel

Une bio-industrie produit de la vitamine B12 par fermentation utilisant une souche de mycète productrice. Dans le cadre d'une recherche d'amélioration des rendements de production, l'entreprise teste deux nouveaux protocoles expérimentaux en bioréacteur pilote : un protocole en batch et un second en fed-batch. On dispose dans les deux cas du moût de fermentation récupéré en fin de procédé après 60 heures de fermentation.

On détermine dans ces moûts la concentration finale de vitamine B12 par dosage microbiologique. La souche utilisée pour le dosage est une entérobactérie : *Escherichia.coli* « B12 », souche auxotrophe vis-à-vis de ce facteur de croissance.

Lors des précédents essais en bioréacteur pilote, les moûts de fermentation récupérés étaient fréquemment contaminés par une souche bactérienne que l'entreprise a pu isoler.

On se propose d'identifier ce contaminant et de déterminer la CMI d'un antibiotique à large spectre régulièrement utilisé dans l'entreprise pour préserver les cultures vis-à-vis de cette souche.

## Objectifs

Réaliser un dosage microbiologique de vitamine B12 issue d'une production en bioréacteur.  
Identifier une souche bactérienne contaminant un moût de fermentation.  
Déterminer la CMI d'un antibiotique vis-à-vis du contaminant.

## Compétences évaluées

Préparer les réactifs milieux et matériels.

Réaliser des techniques d'observation macroscopique et microscopique des microorganismes.

Réaliser des techniques de culture de microorganismes.

Réaliser des techniques d'identification de microorganismes.

Réaliser des techniques de quantification des microorganismes et des virus.

Réaliser des techniques d'études relatives aux agents antimicrobiens.

Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer des résultats.

Valider et interpréter des résultats.

Utiliser l'outil informatique.

## Mise en oeuvre :

Activités professionnelles	Ressources - Documents	Pages	Documents à compléter et à joindre à la copie
<b>1</b> Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation <b>(35 points)</b>	- Fiche protocole 1 - Document 1 : gabarit de dépôts - Fiche technique du spectrophotomètre (au poste de travail)	3 et 4 5	Feuille de traçabilité <b>(page 10)</b>
<b>2</b> Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation <b>(25 points)</b>	- Fiche protocole 2 - Fiche protocole d'ensemencement de la galerie (fournie par le centre) - Fiches de sécurité 1 et 2	6 8 et 9	
<b>3</b> Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S » <b>(20 points)</b>	- Fiche protocole 3	7	

Le dosage est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé ensemencé avec une souche test auxotrophe vis-à-vis de la vitamine B12. La vitamine est déposée par la méthode des disques.

### **Matériel et réactifs**

- Souche test *E.coli* notée « **B12** » isolée sur gélose en boîte de Pétri
- Échantillons à doser :
  - Moût de culture de fin de procédé batch à **t = 60 h** (noté « **batch t = 60 h** »)
  - Moût de culture de fin de procédé fed-batch à **t = 60 h** (noté « **fed-batch t = 60 h** »)
- 2 tubes de 10 mL d'eau physiologique stérile
- Tubes à hémolyse
- Spectrophotomètre ou densitomètre de paillasse (600 nm)
- Cuves spectrophotométriques + parafilm
- 2 boîtes de Pétri carrées 12 cm x 12 cm
- Boîte de Pétri stérile contenant 20 disques cartonnés de diamètre 6 mm
- 12 mL d'une solution tampon phosphate stérile pH 7,5
- 1 mL d'une solution étalon mère de vitamine B12 à 5 µg.mL<sup>-1</sup>
- Tubes Eppendorf stériles de capacité 1,5 mL
- 2 flacons de 60 mL de gélose base\* pour dosage de vitamine, en surfusion à 60°C
- Pipettes automatiques + cônes stériles
- Pipettes graduées ou équivalent stérile de 1, 2 et 5 mL

\*Donnée : Composition de la gélose base pour dosage microbiologique :

- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 6 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 14 g ; glucose : 10 g ; agar : 15 g ; eau distillée : qsp 1 litre

### **Préparation de la culture**

À partir d'une culture de souche test isolée, préparer en eau physiologique 10 mL d'une suspension ajustée à 0,2 unités d'absorbance à 600 nm (à 10 % près).

**Montrer la réalisation des mesures à un examinateur.**

À partir de la suspension ajustée précédemment, réaliser un ensemencement en masse, dans 2 flacons de 60 mL de gélose base (maintenue en surfusion à 60°C), de manière à obtenir environ 2.10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Homogénéiser en évitant la formation de bulles.

**Présenter à un examinateur le calcul de volume d'inoculum avant de réaliser la préparation.**

Après inoculation, couler immédiatement le contenu de chaque flacon dans une boîte de Pétri carrée 12 cm x 12 cm. Après solidification, laisser les boîtes reposer environ 15 minutes avant dépôt des disques.

\*Donnée :

- la correspondance DO-N (UFC.mL<sup>-1</sup>) = .....
- linéarité de la méthode à 600 nm : 0,600.

### **Préparation d'une gamme étalon de vitamine B12 :**

À partir de la solution mère de vitamine B12 à 5 µg.mL<sup>-1</sup>, préparer en tubes Eppendorf stériles une série de 5 dilutions successives suivant une suite géométrique de raison ½ (diluant : tampon phosphate pH 7,5).

**Compléter et faire viser la feuille de traçabilité par un examinateur avant de réaliser la manipulation.**

<b>FICHE PROTOCOLE 1 (SUITE)</b>	<b>Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation.</b>	
--------------------------------------	--	--

### **Dépôt des solutions de vitamine B12**

Imprégner préalablement les 2 séries de disques fournis avec 10 µL des différentes solutions :

- les 5 dilutions de vitamine B12 et la solution mère
- le prélèvement en fed-batch (1 essai)
- le prélèvement en batch (1 essai)
- une solution tampon phosphate pH 7,5 sur le dernier disque

Déposer ensuite les disques à la surface du milieu selon le gabarit fourni (**document 1**).

Laisser reposer sur la pailleuse pendant 30 minutes à température ambiante.

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

### **Compte rendu** (sur la copie)

**1.1** - Après avoir analysé la composition de la gélose base utilisée, justifier l'emploi de ce milieu.

**1.2** - Justifier le temps d'attente de 30 minutes à température ambiante avant incubation.

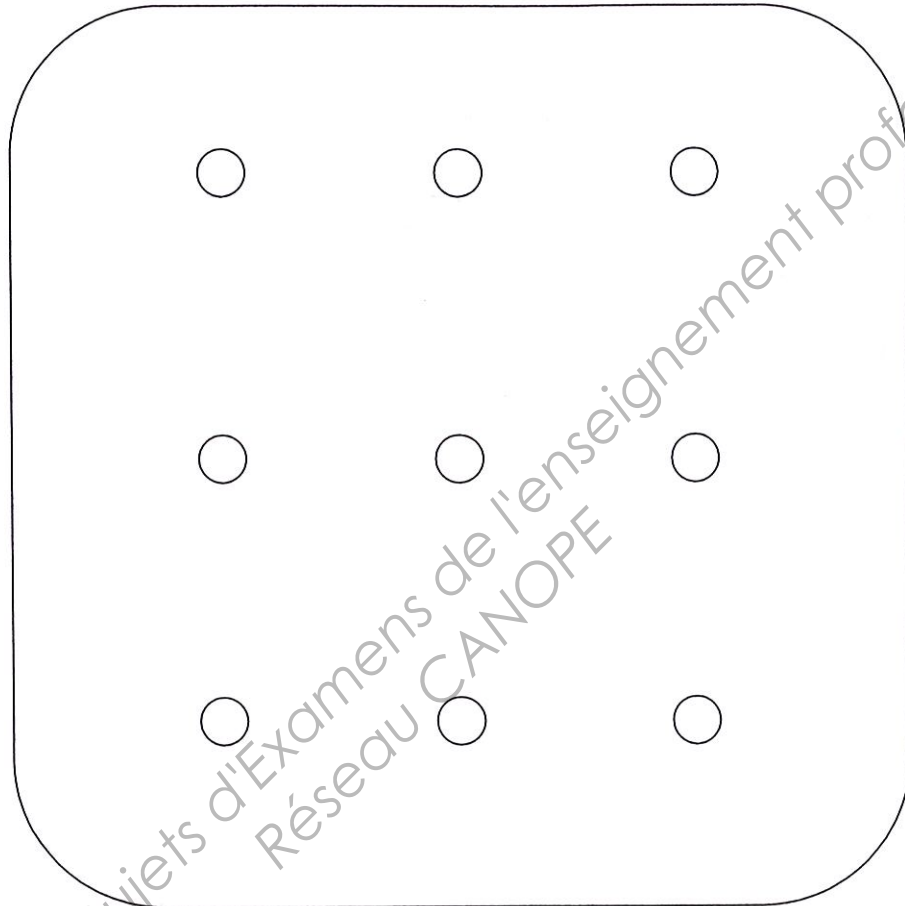
**1.3** - Justifier le dépôt de tampon phosphate pH 7,5 sur le dernier disque.

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

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2011
Nom de l'épreuve : Techniques de microbiologie - 1 <sup>er</sup> jour	Code : BAE5TM/1 Page : 4/10

**DOCUMENT 1**

**Gabarit de dépôts (9 disques – 12 cm x 12 cm)**



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

FICHE PROTOCOLE 2	Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation	
-------------------	---	--

La souche bactérienne « S » a été isolée sur gélose nutritive inclinée. On procède à son identification.

**Matériel et réactifs**

- Réactifs pour la coloration de Gram
- Réactifs pour tests enzymatiques rapides

**Mode opératoire**

Réaliser les examens nécessaires à l'orientation de l'identification.

***Montrer la réalisation des tests à un examinateur.***

Proposer une liste de milieux adaptés à la vérification du genre et de l'espèce.

***Faire viser la liste sur la feuille de traçabilité par un examinateur au plus tard une heure avant la fin de l'épreuve.***

Ensemencer la galerie distribuée par le centre d'examen et incuber à 37°C pendant 24 heures.

**Compte rendu** (sur la copie)

**2.1** - Consigner les résultats obtenus et orienter l'identification.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement Professionnel  
Réseau CANOPE

FICHE PROTOCOLE 3	Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S ».	
-------------------	---	--

Afin d'éliminer le contaminant « S » des cuves de fermentation, il est possible d'ajouter un antibiotique à large spectre dans le milieu de culture : l'ampicilline. On souhaite optimiser le traitement.

### **Matériel et réactifs**

- 5 mL d'une culture de la souche « S » en bouillon Mueller Hinton à environ  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>
- Pipette automatique P<sub>1000</sub> + cônes stériles
- 4 mL de solution d'ampicilline à 10 µg.mL<sup>-1</sup>, notée « Amp »
- 9 tubes à hémolyse vides et stériles
- 1 flacon contenant 20 mL de bouillon Mueller Hinton

### **Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis du contaminant « S »**

À partir de la solution d'ampicilline à 10 µg.mL<sup>-1</sup>, réaliser en tubes à hémolyse stériles 8 dilutions successives suivant une suite géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  en bouillon Mueller Hinton (volume final 1 mL) : identifier les tubes par leur concentration en ampicilline en µg.mL<sup>-1</sup>.

Ajouter 1 mL de l'inoculum à  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> à chaque dilution d'ampicilline et réaliser un témoin pour valider la méthode. Incuber la gamme et le témoin à 37°C pendant 48 heures.

### **Compte rendu** (sur la copie)






**3.1** - Donner la composition du témoin utilisé et justifier son rôle.

**3.2** - Compléter le tableau de préparation de la gamme (feuille de traçabilité).






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



# FICHE DE SÉCURITÉ 1

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS DE COLORATION</b>		
<b>Cristal Violet</b> <span style="float: right;"><i>Autre dénomination : Violet de gentiane</i></span>		
 <b>T</b>	Benzèneméthanol, 4-(diméthylamino)- $\alpha$ -hydrochlorure $C_{25}H_{30}N_3Cl$  Solvant : éthanol, oxalate d'ammonium	<b>R45</b> – Peut causer le cancer. <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés. <b>S45</b> – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). <b>S53</b> – Éviter l'exposition et se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.
<b>Réactif de Lugol</b> <span style="float: right;"><i>Autres dénominations : Réactif iodo-ioduré, Solution d'iodure de potassium iodée</i></span>		
 <b>Xn</b>	Iode $I_2$  Iodure de potassium KI	<b>R20/21</b> – Nocif par inhalation et par contact avec la peau. <b>S23</b> – Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols. <b>S25</b> – Éviter le contact avec les yeux.
<b>Éthanol</b>  <b>Danger</b>	Éthanol (alcool éthylique dénaturé) 95 % $CH_3CH_2OH$	<b>H 225</b> : Liquide et vapeurs très inflammables.  <b>P 210</b> : Tenir à l'écart de la chaleur/ des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer.
<b>Éthanol</b>  <b>F</b>		<b>R11</b> – Facilement inflammable. <b>S7</b> – Conserver le récipient bien fermé. <b>S16</b> – Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer.
<b>Fuchsine</b> <span style="float: right;"><i>Utilisée après dilution au 1/10<sup>e</sup></i></span>		
 <b>Xn</b>	Rosaniline $C_{20}H_{20}ClN_3$  Solvant : éthanol, phénol	<b>R10</b> – Inflammable. <b>R21/22</b> – Nocif par contact avec la peau et par ingestion. <b>R36/38</b> – Irritant pour les yeux et la peau. <b>S36/37</b> – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

## FICHE DE SÉCURITÉ 2

REACTIF & PICTOGRAMME	ÉTIQUETAGE	PHRASES DE SECURITE
<b>REACTIFS POUR TESTS ENZYMATIQUES</b>		
<p>« Réactif oxydase »</p> <div style="text-align: center;">   <b>Attention</b> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">   <b>Xn</b> </div>	<p>TMPD : N, N, N', N'- tétraméthyl-1,4- phénylènediamine C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub></p>	<p>H 302 Nocif par ingestion. H 312 Nocif par contact cutané. H 332 Nocif par inhalation.</p> <p>R20/21/22 – Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. S28.1 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.</p> <p><i>Le conditionnement en disque déshydraté ne justifie pas de mesure de protection particulière.</i></p>
<p><b>Peroxyde d'hydrogène</b></p> <div style="text-align: center;">   <b>Danger</b> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">   <b>O</b> </div> <div style="text-align: center;">   <b>C</b> </div> </div>	<p><i>Autre dénomination : Eau oxygénée</i></p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p>Peroxyde d'hydrogène &gt; à 60% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>	<p>H 302 : Nocif par ingestion. H 31 : Provoque des lésions oculaires graves. H 331 : Toxique par inhalation.</p> <p>P 261 : Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz /brouillards/ vapeurs/aérosols. P 280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P305 + P351 + P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <hr style="border-top: 1px solid black;"/> <p>R8 – Favorise l'inflammation des matières combustibles. R34 – Provoque des brûlures. S3 – Conserver dans un endroit frais. S28.1 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. S36 – Porter un vêtement de protection approprié. S45 – En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).</p>

# FEUILLE DE TRAÇABILITÉ

(à rendre avec la copie)

NOM DE L'OPÉRATEUR .....

Date : .....

Poste n° .....

## 1 - Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation

Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage

Volume final préparé pour chaque dilution (en  $\mu\text{L}$ ) :

Tableau de préparation de la gamme d'étalonnage à proposer :

## 2 - Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation

Liste des milieux :

## 3 - Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »

Tableau de préparation de la gamme d'ampicilline

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
$V_{\text{ampicilline à } 10 \mu\text{g.mL}^{-1}}$ (mL)								
V reprise (mL)								
V bouillon MH (mL)								
V inoculum (mL)								
$C_{\text{ampicilline}}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )								