



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Campagne 2012

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

ÉPREUVE E3 – UNITÉ U32 MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2012

Durée : 3 heures
Coefficient : 3

Matériel autorisé :

- 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 (Cirulaire n°99-186, 16/11/1999)

**Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 8 pages, numérotées de 1/8 à 8/8.**

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Microbiologie et technologies d'analyse	Code : BAE3MT	Page : 1/8

PRODUCTION INDUSTRIELLE D'INSECTICIDE PAR BACILLUS THURINGIENSIS

Bacillus thuringiensis, bactérie appartenant naturellement à la flore du sol, possède la capacité de tuer des insectes. Cet effet pathogène est dû aux cristaux protéiques que la bactérie synthétise lors de la sporulation. Ingerés par l'insecte, ces cristaux libèrent des toxines qui détruisent les cellules de son tube digestif, provoquant rapidement un arrêt de sa consommation alimentaire puis sa mort. Il existe de nombreuses variétés de *Bacillus thuringiensis*, chacune n'étant toxique que pour un nombre limité d'insectes. Il en résulte le bioinsecticide le plus utilisé dans le monde actuellement.

CARACTÉRISTIQUES DE BACILLUS THURINGIENSIS (18 points)

Bacillus thuringiensis est une bactérie insecticide à Gram positif capable de sporuler.

1 - Structure et comportement environnemental de *B. thuringiensis* (12 points)

- 1.1 - En se basant sur des caractères structuraux, justifier la coloration différentielle des bactéries dans la technique de Gram.
- 1.2 - La sporulation a été bien étudiée chez *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*.
 - 1.2.1 - Reporter sur la copie les numéros 1 à 8 du **document 1** et donner les légendes correspondantes.
 - 1.2.2 - Proposer une méthode de coloration des spores bactériennes.
 - 1.2.3 - La thermorésistance est une propriété des spores bactériennes des *Bacillus*. Quelles sont les structures et propriétés physico-chimiques de la spore à l'origine de cette propriété ?
 - 1.2.4 - Indiquer les conditions environnementales amenant une forme bactérienne végétative à sporuler.

2 - Systématique bactérienne (6 points)

La principale différence phénotypique entre *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* est la production d'un ou plusieurs cristaux à propriétés insecticides. Par ailleurs, de récentes études moléculaires ont montré que ces bactéries pouvaient être considérées comme une seule et même espèce.

- 2.1 - Quelles études moléculaires permettent de remettre en question la taxonomie phénotypique ?
- 2.2 - Une classification des *Bacillus thuringiensis* en différents sérotypes est basée sur la présence de déterminants antigéniques flagellaires. Rappeler le principe d'une telle détermination sérotypique.

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE FERMENTATION INDUSTRIEL (42 points)

Afin d'améliorer les rendements de production de bioinsecticide, plusieurs pistes sont envisagées, notamment le développement de nouveaux fermenteurs. Historiquement, les cultures en batch de *B. thuringiensis* ont été conduites. Afin de réduire les coûts de production liés notamment au milieu de culture utilisé, différentes alternatives sont testées : choix différentiels du milieu de culture et du procédé de fermentation.

3 - Évaluation de procédés de culture en milieu liquide (36 points)

Dans le cadre de la lutte contre *Spodoptera littoralis*, ver parasite des cultures de coton, une étude comparative cherche à distinguer le mode de production le plus efficace et rentable. La chronologie et les étapes de cette étude sont résumées dans le **document 2**.

3.1 - Choix du milieu de culture (17 points)

Six milieux de culture différents (numérotés de 1 à 6) sont testés lors d'une culture de *B. thuringiensis* en batch.

- 3.1.1 - Quel contrôle fondamental doit être réalisé sur la préculture avant ensemencement du fermenteur ?

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Microbiologie et technologies d'analyse	Code : BAE3MT	Page : 2/8

- 3.1.2** - Justifier la supplémentation du milieu de préculture en extrait de levure.
- 3.1.3** - Qu'est-ce qu'une peptone en bactériologie ? Préciser son intérêt nutritionnel.
- 3.1.4** - D'après les conditions expérimentales de la culture, préciser le type respiratoire probable de *Bacillus thuringiensis*.
- 3.1.5** - Préciser pour chacun de ces milieux de culture la(les) source(s) de carbone utilisable(s). En déduire les deux milieux les plus riches de ce point de vue.
- 3.1.6** - Le **document 3** présente les résultats obtenus avec chacun des milieux.
- Analyser les graphes.
 - Conclure quant au choix des milieux les mieux adaptés à la production de bioinsecticide.
 - Corréler le choix final du milieu en tenant compte d'un critère économique.
- 3.2** - Choix du procédé de fermentation (19 points)
- 3.2.1** - Schématiser un fermenteur de type batch.
- 3.2.2** - Des mousses apparaissent fréquemment au cours d'une fermentation en bioréacteur. Expliquer leur formation. Pourquoi est-il nécessaire de les limiter ?
- 3.2.3** - Indiquer la différence fondamentale entre une culture en batch et une culture en fed-batch.
- 3.2.4** - Analyser l'allure des courbes présentées dans le **document 4**. En déduire l'intérêt d'envisager une culture en fed-batch.
- 3.2.5** - Le **document 5** présente les résultats en culture fed-batch.
- 3.2.5.1** - Calculer le débit d'apport de mélasse en g de mélasse par litre de milieu par heure.
- 3.2.5.2** - Montrer l'intérêt d'adapter le procédé de fermentation pour la production de bioinsecticide.

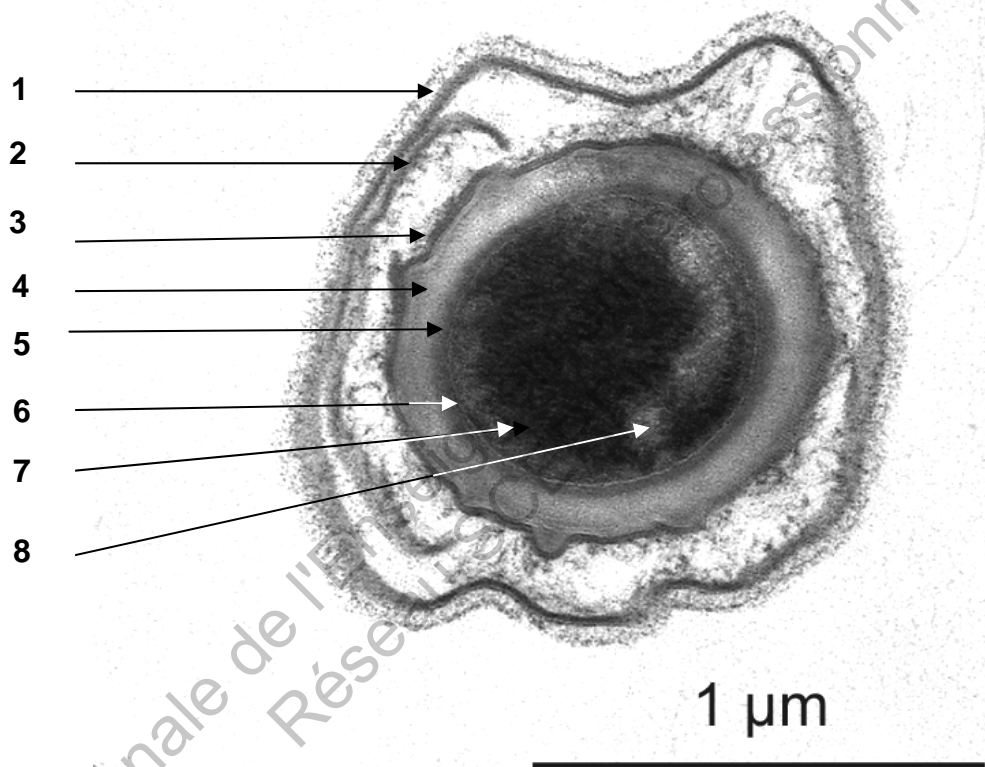
4 - Évaluation d'un nouveau procédé de culture en milieu solide (6 points)

Spodoptera frugiperda est un ver parasite qui infecte les cultures de maïs. Il est détruit *in situ* par *Bacillus thuringiensis tolworthi*. Cette observation est à l'origine d'une nouvelle stratégie qui utilise la fermentation en milieu solide. À cette fin, du riz humide stérile contenu dans des sacs en polypropylène estensemencé à l'aide d'une préculture de *Bacillus thuringiensis tolworthi* cultivée en incubateur à agitation (paramètres 30°C, 15h, 150 rpm). Une fois scellés, les sacs sont incubés à 30°C durant 4 jours. Un suivi de la production de spores est entrepris. Les résultats sont présentés dans le **document 6**.

- 4.1** - Sur quel principe repose le dénombrement des spores ?
- 4.2** - Définir puis déterminer en justifiant la démarche les paramètres cinétiques μ_{expo} et G de la croissance.

DOCUMENT 1 :

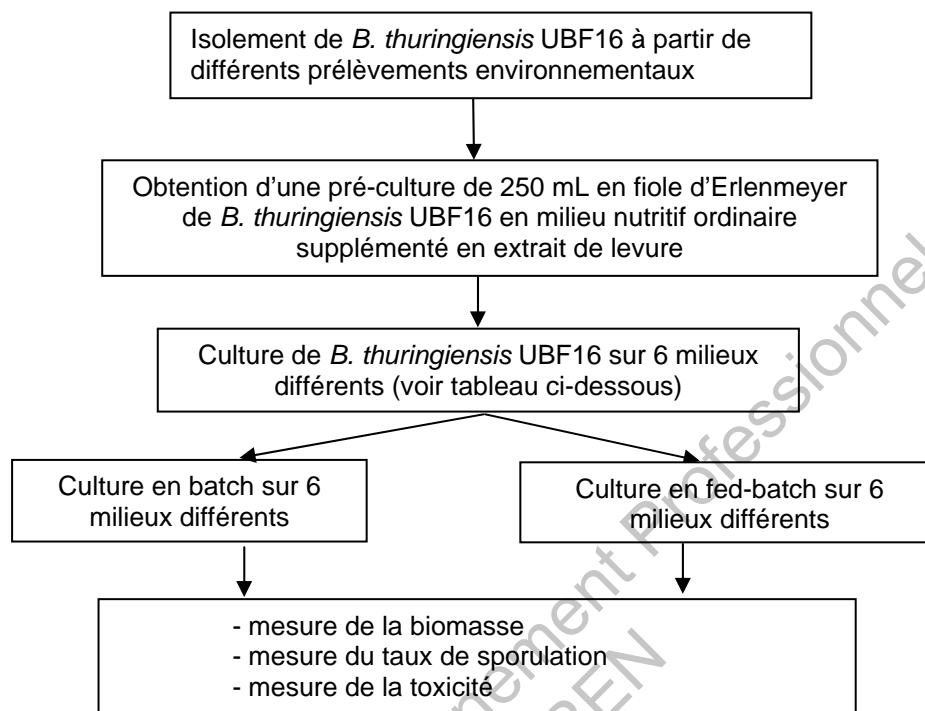
MORPHOLOGIE D'UNE SPORE BACTÉRIENNE



Coupe de spore de *Bacillus cereus*
observée en microscopie électronique (C Faille)

DOCUMENT 2 :

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE *B. THURINGIENSIS* EN CULTURE BATCH ET FED-BATCH



Conditions opératoires

Expérimentation de la culture en batch :

- inoculation 1% v/v
- volume de travail 2 L
- stérilisation du milieu *in situ*
- température de culture 30°C
- agitation : 200 rpm
- saturation O₂ : 20%
- agent anti-mousse
- milieu de culture testé

Expérimentation de la culture en fed-batch :

Paramètres initiaux identiques à la culture en batch avec apport de mélasse à 20 g/L au débit de 2,5 mL/L/h (arrêt apport après 40 heures)

Composition des milieux de culture testés

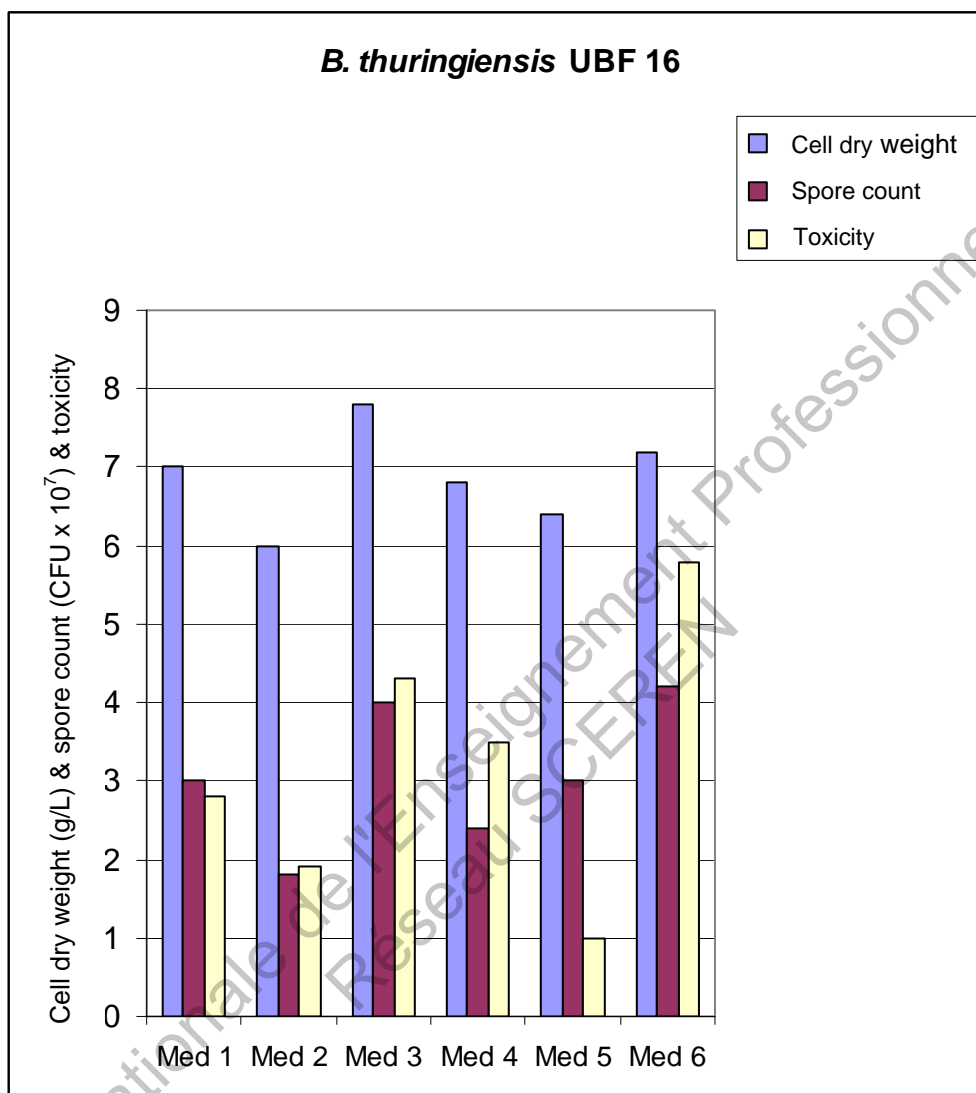
milieu	Composition (g.L ⁻¹)
Milieu 1 : LB	Glucose (1) – yeast extract (5) – casein (10) – NaCl (5) – pH 7
Milieu 2 : T ₃	Tryptone (3) – tryptose (2) – yeast extract (1,5) – MnCl ₂ (0,005) – pH 6,8
Milieu 3	Tryptose (20) – glucose (2) – NaCl (5) – Na ₂ HPO ₄ (2,5)
Milieu 4	Peptone (3) – beef extract (5) – yeast extract (0,5) – MnCl ₂ (0,006) – CaCl ₂ (0,08) – MgCl ₂ (0,7)
Milieu 5	Peptone (10) – beef extract (10) – NaCl (5)
Milieu 6	Fodder* yeast (40) – molasses** (15) – K ₂ HPO ₄ (1) – MgSO ₄ , 7 H ₂ O

* fourragère

** mélasses

DOCUMENT 3 :

PRODUCTION DE *B. THURINGIENSIS* EN CULTURE BATCH : CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE

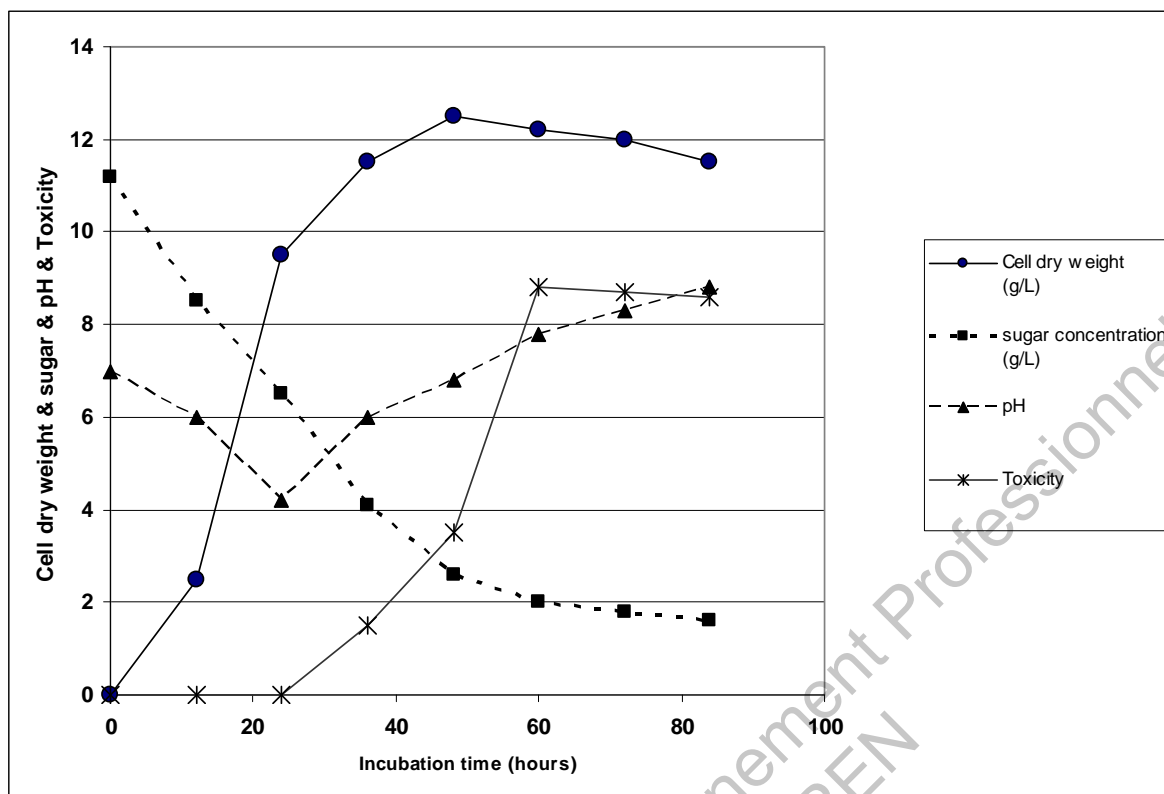


Cell dry weight and spore count of *B. thuringiensis* UBF 16 strains and its toxicity against cotton leafworm* after 72 h incubation on different media at 30 °C using shake flask as a batch culture.

* cotton leafworm : chenille de la noctuelle du coton.

DOCUMENT 4 :

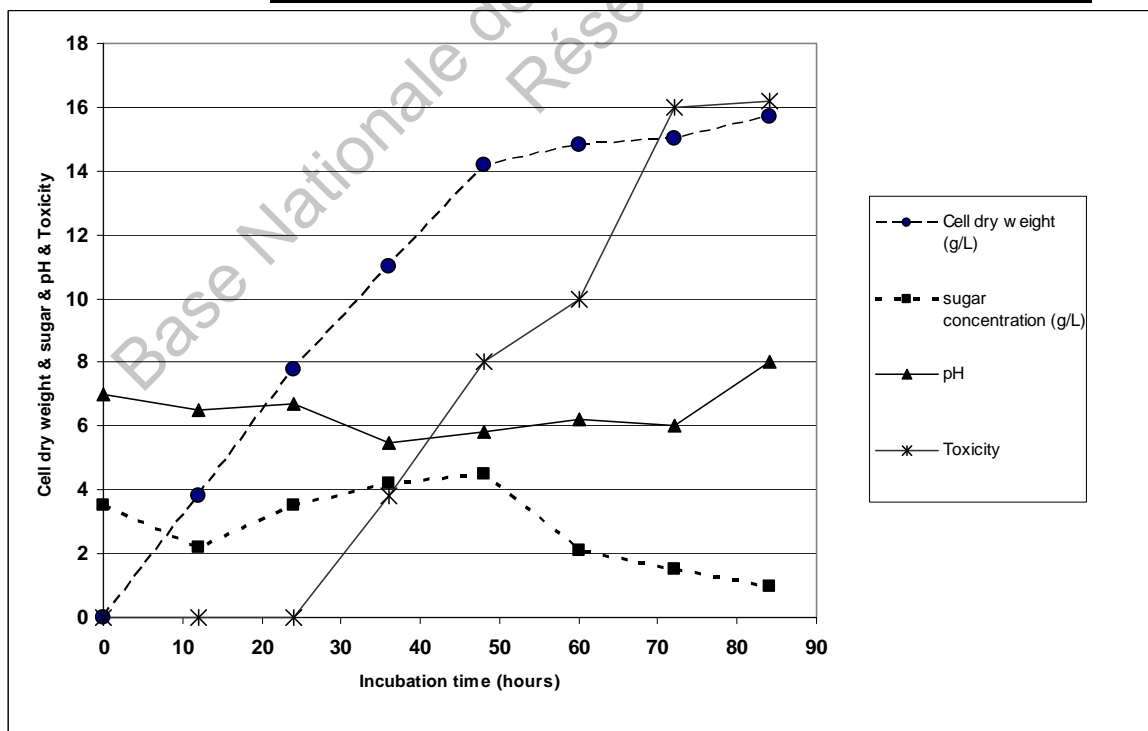
SUIVI D'UNE FERMENTATION EN BATCH



Growth of *B. thuringiensis* UBF16 on fodder yeast-molasses, consumed sugar, pH and toxicity during 72h at 30°C using bioreactor as a batch culture.

DOCUMENT 5 :

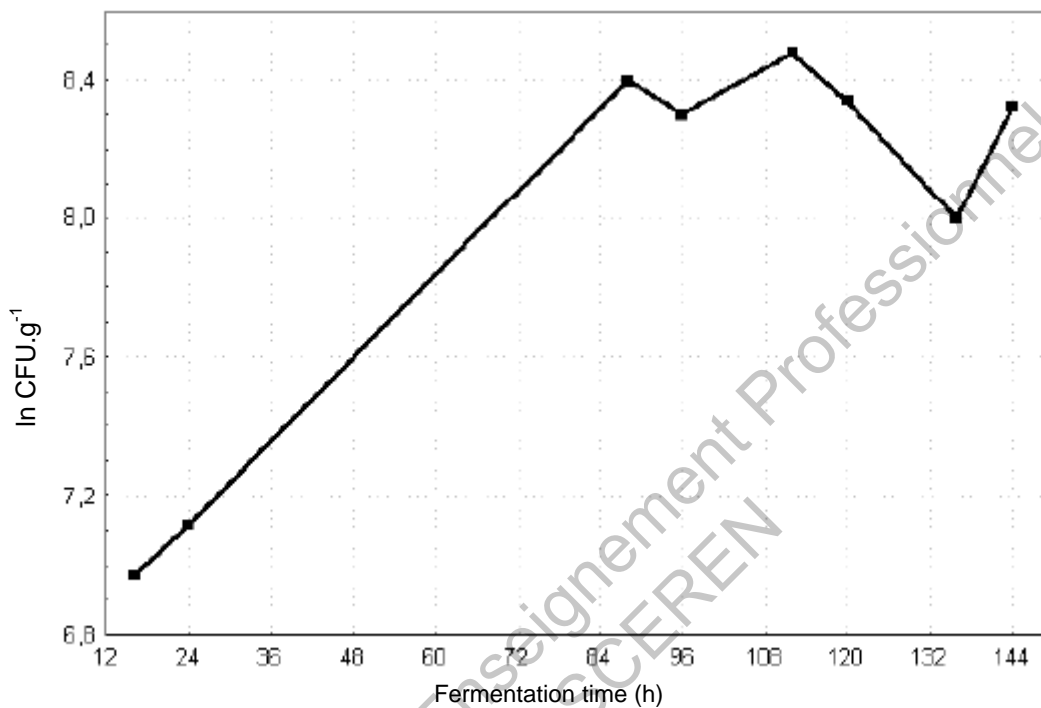
SUIVI D'UNE FERMENTATION EN FED-BATCH



Growth of *B. thuringiensis* UBF16, consumed sugar, pH and toxicity (%) on fodder yeast-molasses medium using bioreactor as a fed-batch culture at 2.5 mL.L⁻¹.h⁻¹ continuous addition rate of molasses.

DOCUMENT 6 :

**FERMENTATION DE *BACILLUS THURINGIENSIS TOLWORTHII* (Btt)
EN MILIEU SOLIDE**



Spore-count during Btt growth by solidsubstrate fermentation on rice.