



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

**Ce document a été mis en ligne par le Réseau Canopé
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.

BTS MÉTIERS DE L'EAU

BIOCHIMIE BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX – U. 4

SESSION 2019

—
Durée : 4 heures
Coefficient : 4
—

Calculatrice non autorisée.
Matériel autorisé : aucun.

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 2019
Biochimie, biologie microbiologie des eaux – U4	Code : MTBBM	Page : 1/11

IMPACT DES MICROPOLLUANTS SUR LES EAUX

La présence de micropolluants dans l'eau est une question d'actualité.

Ainsi, un plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux (PNRM) s'est achevé en 2015. L'objectif était de faire un état des lieux des résidus de médicaments retrouvés dans l'eau et d'évaluer les risques environnementaux et sanitaires.

Dans cette étude, nous allons nous intéresser à la carbamazépine, un anti-épileptique, qui fait partie des molécules les plus fréquemment retrouvées dans les eaux de surface.

Une cartographie du devenir des micropolluants dans les stations d'épuration de type « boues activées à aération prolongée » a été établie : environ 80 % du flux de micropolluants en entrée de station d'épuration (STEP) n'est plus retrouvé en sortie.

À l'opposé, plusieurs substances comme la carbamazépine ne sont pratiquement pas affectées par le passage à travers les procédés primaires et secondaires : rendement inférieur à 30 %. En revanche, les procédés tertiaires avancés comme l'ozonation ont des rendements supérieurs à 70 %.

1. SUIVI MICROBIOLOGIQUE DES EAUX (26 POINTS)

La station d'épuration étudiée rejette ses effluents au niveau d'une zone de baignade. Cette station possède une installation de traitement par chloration, qui ne permet pas d'éliminer totalement la carbamazépine. Il a donc été décidé de remplacer le traitement de chloration par un traitement avancé des micropolluants comprenant une ozonation suivi d'une filtration sur sable.

- 1.1. **Schématiser** la filière eau d'une station d'épuration à boues activées en y intégrant le traitement avancé retenu.

Le chlore et l'ozone sont deux substances pouvant être utilisées comme désinfectant.

- 1.2. **Indiquer** le type de réaction chimique induit par ces deux substances sur les micro-organismes.
- 1.3. **Présenter**, sous forme d'un tableau, un avantage et un inconvénient de ces deux désinfectants dans le cadre du traitement des eaux usées.

Les effluents de la STEP sont rejetés au niveau d'une zone de baignade. Pour vérifier l'absence de risque lié à des bactéries pathogènes dans l'eau de baignade, des « germes indicateurs de contamination fécale » (GICF) sont recherchés et dénombrés.

- 1.4. **Définir** le pouvoir pathogène.
- 1.5. **Proposer** trois caractéristiques d'un germe indicateur de contamination fécale (GICF).

Le GICF choisi et dénombré est l'espèce bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*), un bacille à Gram négatif, oxydase négative, aéro-anaérobie facultatif, lactose positif.

- 1.6. Dans le cas de cette bactérie, **décrire** les observations correspondant aux résultats attendus pour :
- la coloration de Gram ;
 - le test enzymatique ;
 - le type respiratoire.

La recherche et le dénombrement des coliformes et d'*E. coli* selon la norme NF EN ISO 9308-1 **annexe 1** ont été réalisés pour l'eau de baignade, après la mise en place du traitement d'ozonation-filtration. L'**annexe 2** présente les limites de qualité des eaux de baignade en eaux douces.

- 1.7. **Représenter**, sous forme d'un logigramme de manipulation, les étapes de ce mode opératoire dans le cas d'*E. coli*.
- 1.8. **Expliquer** la couleur de la gélose sous les colonies typiques.
- 1.9. À l'aide des valeurs expérimentales obtenues, **exprimer** le résultat du dénombrement des *E. coli* en utilisant l'unité appropriée.
- 1.10. **Conclure** sur la qualité microbiologique de l'eau testée.

2. ÉTUDES *IN VITRO* DES EFFETS DE LA CARBAMAZÉPINE (28 POINTS)

Les analyses d'écotoxicité d'un produit chimique peuvent être menées en analysant la croissance d'organismes vivants à l'état planctonique ou au sein de biofilms.

Étude 1 : effet de la carbamazépine sur la croissance de *Chlorella vulgaris*.

Dans un premier temps, afin d'analyser les effets environnementaux de la carbamazépine, la croissance d'un organisme photosynthétique, l'algue unicellulaire *Chlorella vulgaris*, est étudiée.

- 2.1. **Indiquer** le type trophique (source de carbone) de *Chlorella vulgaris*.
- 2.2. **Nommer** l'organite responsable de la photosynthèse.

L'étude *in vitro* de l'impact de la carbamazépine sur la croissance de *Chlorella* consiste à déterminer la vitesse spécifique de croissance maximale, μ_{\max} , obtenue durant la phase exponentielle. Une culture algale est réalisée, en milieu non renouvelé, en présence ou non de carbamazépine. Les courbes de croissance sont fournies dans l'**annexe 3**.

- 2.3. **Expliquer** l'intérêt de comparer les deux cultures.
- 2.4. **Indiquer** dans un tableau, pour chacune des 5 phases de croissance observées sur la courbe en absence de carbamazépine :
- le nom de la phase ;
 - sa durée ;
 - l'évolution de la vitesse spécifique de croissance μ .

La détermination des vitesses spécifiques de croissance maximale a donné les résultats suivants :

- culture en absence de carbamazépine $\mu_{\max} = 2 \text{ j}^{-1}$;
- culture en présence de carbamazépine $\mu_{\max} = 0,66 \text{ j}^{-1}$.

2.5. **Comparer** et **commenter** ces valeurs.

Étude 2 : effet de la carbamazépine sur des biofilms naturels.

Dans un deuxième temps, les effets de la carbamazépine ont été étudiés sur les micro-organismes des biofilms prélevés dans une rivière.

2.6. **Proposer** une définition d'un biofilm.

2.7. **Énumérer** et **expliquer** succinctement les étapes de formation d'un biofilm.

2.8. Dans le cadre de cette étude, **citer** l'avantage qu'ont les micro-organismes à s'organiser en biofilm.

Une étude d'écotoxicité a été menée sur des biofilms *in vitro*. Les résultats obtenus sont fournis dans l'**annexe 4**.

2.9. **Comparer** les résultats de microscopie des biofilms observés en absence et en présence de carbamazépine pour chacun des marquages étudiés.

2.10. **Interpréter** ces observations et **conclure**.

3. MISE EN PLACE DE L'OZONATION ET SUIVI DE L'ÉTAT ÉCOLOGIQUE DU MILIEU RÉCEPTEUR (26 POINTS)

L'écotoxicité de la carbamazépine a été étudiée sur l'écosystème de la rivière en sortie de la STEP, et notamment sur 4 organismes :

- *Vibrio fischeri*, une bactérie gram-négatif saprophyte luminescente ;
- *Chlorella vulgaris*, une algue verte unicellulaire photoautotrophe ;
- *Daphnia magna*, un microcrustacé appartenant au zooplancton ;
- *Oryzias latipes*, une espèce de poisson, originaire d'Asie du sud-est, organisme modèle en laboratoire du fait de sa facilité d'élevage.

3.1. **Proposer** une définition des trois termes soulignés.

Les quatre organismes étudiés appartiennent à des niveaux trophiques différents de la chaîne alimentaire.

3.2. **Schématiser** cette chaîne alimentaire et, pour chaque niveau trophique, **faire correspondre** une des quatre espèces mentionnées.

Les résultats des études d'écotoxicité sur ces organismes sont présentés en **annexe 5**.

3.3. **Analyser** les résultats fournis et **conclure** sur l'espèce la plus sensible à la carbamazépine.

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2019
Biochimie, biologie microbiologie des eaux – U4	Code : MTBBM	Page : 4/11

- 3.4. **Expliquer** quelle serait la conséquence sur la chaîne alimentaire de la disparition de cette espèce dans l'écosystème.

Avant la mise en place du traitement tertiaire par ozonation, l'indice biologique global normalisé (IBGN) avait été déterminé dans la rivière en sortie de la STEP afin d'étudier la qualité biologique du cours d'eau. Après la mise en place du traitement, une nouvelle détermination de l'IBGN a été réalisée afin d'être comparée aux premiers résultats obtenus. L'annexe 6 présente les résultats obtenus et un extrait de la norme NF T 90-350 qui précise comment déterminer l'IBGN.

- 3.5. À l'aide des résultats fournis dans le tableau 1, **déterminer** la variété taxonomique (Σt) avant et après mise en place de l'ozonation. **Déterminer** le groupe faunistique indicateur (GI), avant et après la mise en place de l'ozonation en croisant les tableaux 1 et 2. En **déduire** les deux IBGN correspondants.
- 3.6. **Conclure** sur la qualité biologique du milieu récepteur étudié ainsi que sur l'intérêt de l'ozonation dans l'élimination des micropolluants à l'aide des données ci-dessous.

Grille d'interprétation de la qualité biologique du milieu à partir de la note IBGN.

Note IBGN	≥ 17	16-13	12-9	8-5	≤ 4
Classe de qualité	Très bonne	Bonne	Passable	Mauvaise	Très mauvaise

Annexe 1 - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Méthode par filtration sur membrane

Extrait de la norme NF EN ISO 9308-1

1. Filtration

Filtrer 100 mL de l'échantillon à analyser sur une membrane filtrante (47 mm de diamètre, porosité nominale de 0,45 µm).

2. Incubation et différenciation, essai standard

Après filtration, placer la membrane sur la boîte de Petri contenant la gélose lactosée au TTC (voir paragraphe 4), en veillant à ne pas emprisonner de bulles d'air dessous.

Incuber à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h.

Examiner les membranes et considérer comme bactéries lactose-positives toutes les colonies typiques, quelle que soit leur taille, si le milieu sous la membrane présente une coloration jaune.

Pour les essais de l'oxydase et de l'indole, repiquer de préférence toutes les colonies typiques obtenues ou un nombre représentatif (au moins 10), respectivement sur gélose non sélective et dans un bouillon au tryptophane.

Incuber la gélose non sélective à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h et effectuer l'essai à l'oxydase.

Incuber le tube contenant le bouillon au tryptophane à $(44 \pm 0,5)$ °C pendant (21 ± 3) h et contrôler la production d'indole en ajoutant 0,2 mL à 0,3 mL de réactif de Kovacs. L'apparition d'une coloration rouge à la surface du bouillon confirme la production d'indole. Considérer toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase comme étant des bactéries coliformes.

Considérer toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase, mais positive à l'indole, comme étant des *E. coli*.

3. Expression des résultats

À partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées sur les membranes et en tenant compte des résultats d'essais de confirmation effectués, calculer le nombre d'*E. coli*, de bactéries coliformes et, si nécessaire, de bactéries lactose-positives présentes dans 100 mL d'échantillon.

4. Composition de la gélose lactosée au TTC

Lactose, peptone, extrait de levure, extrait de viande, bleu de bromothymol, chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC), heptadécylsulfate de sodium (Tergitol 7), agar-agar, eau.

Résultats du dénombrement

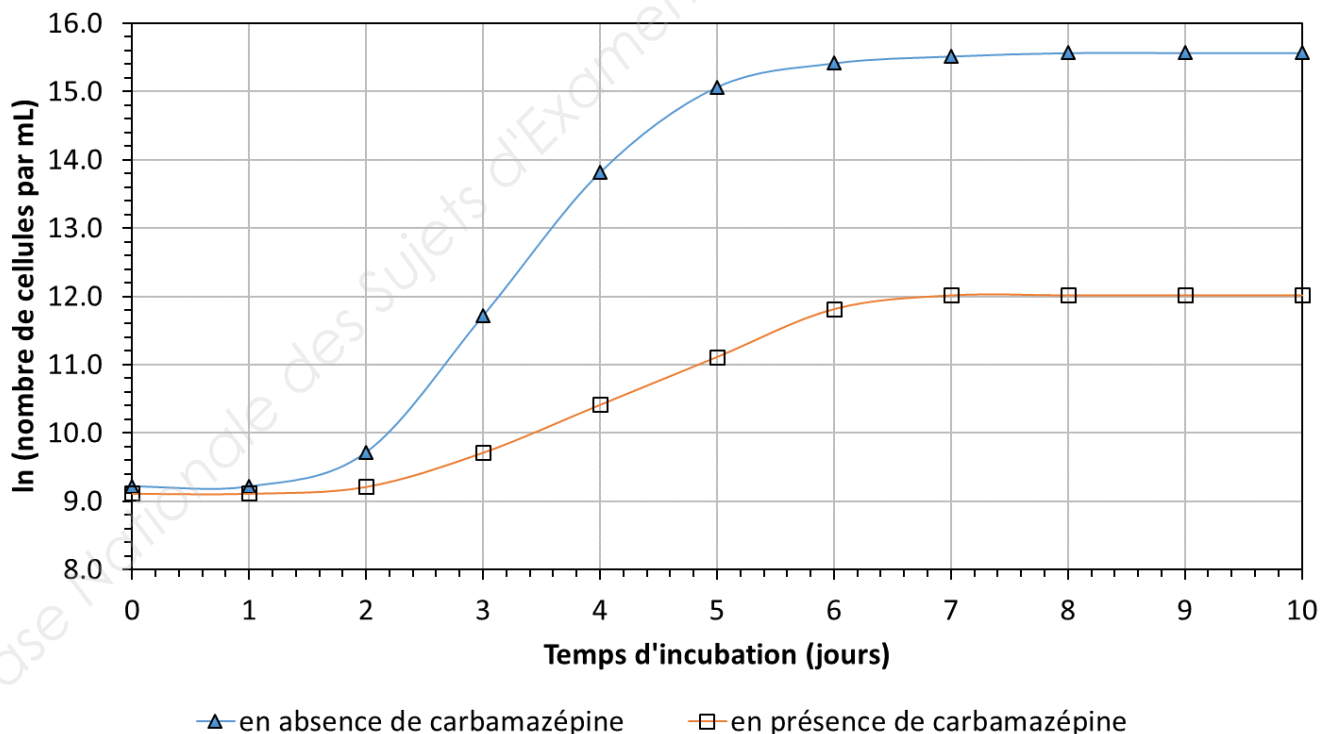
L'eau analysée est diluée 10 fois avant filtration.

Caractéristiques	Nombre de colonies sur la membrane
Colonies typiques	25
Colonies typiques oxydase –	23
Colonies typiques oxydase – et indole +	19

**Annexe 2 - Limites de qualité des eaux de baignade en eaux douces
(Extrait de l'arrêté du 22 septembre 2008)**

Paramètre en UFC/100 mL \ Quality	Excellente	Bonne	Suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
Entérocoques intestinaux	200	400	330	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	1200	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

Annexe 3 - Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris* en absence et en présence de carbamazépine



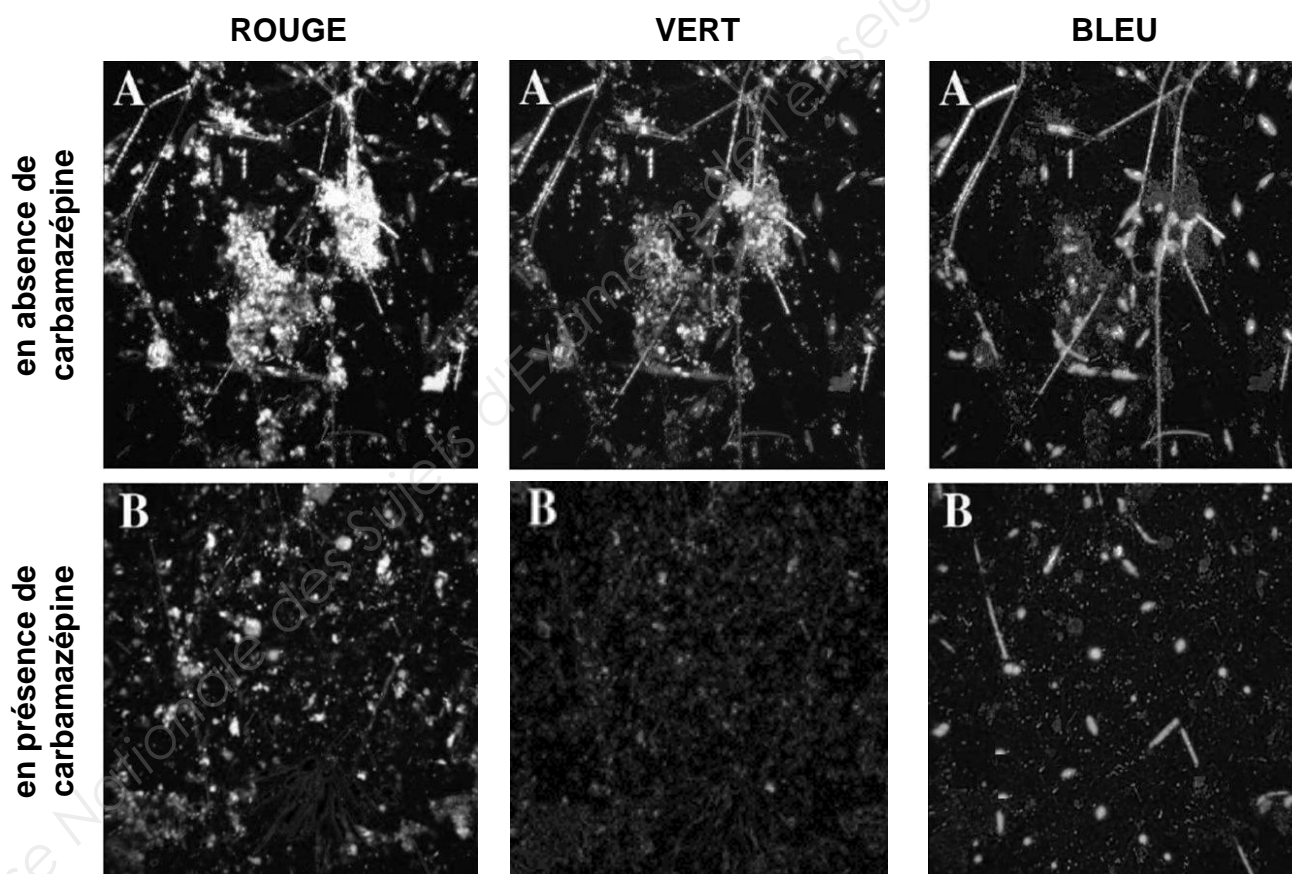
Annexe 4 - Étude *in vitro* des effets de la carbamazépine sur un biofilm en sortie de STEP

Des biofilms naturels ont été cultivés huit semaines en bioréacteurs contenant de l'eau de sortie de STEP. La carbamazépine a été ajoutée en continu afin d'obtenir une concentration finale de 10 µg/L d'eau. L'analyse microscopique de la composition des biofilms a été réalisée à l'aide de marqueurs fluorescents permettant un marquage coloré de différents constituants du biofilm : bactéries, algues et exopolymères de surface (EPS). Les photographies ci-dessous illustrent la composition et l'architecture d'un biofilm témoin (A) et d'un biofilm mis en présence de carbamazépine (B).

Les photographies A et B ont été décomposées par couleur :

- un signal rouge intense correspond à l'EPS ;
- un signal vert intense met en évidence les bactéries ;
- un signal bleu intense représente les micro-organismes photosynthétiques (cyanobactéries et algues).

L'ensemble des éléments marqués par fluorescence apparaît en blanc sur les images ci-dessous.



Adapté de Lawrence et al. ; Can J Microbiol, 2005 Aug ; 51(8):655-69

Annexe 5 - Étude de l'écotoxicité de la carbamazépine

La toxicité est généralement exprimée à l'aide de l'indice EC_{50} pour « Effective Concentration 50 » qui indique la concentration en substance testée (la carbamazépine ici) pour laquelle la moitié des êtres vivants observés manifeste le critère choisi (perte de la mobilité, inhibition de croissance, mort...).

La concentration obtenue permet de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. En fonction de leur EC_{50} , les composés peuvent être séparés en cinq catégories selon la directive européenne 93/67/EEC (tableau 1).

Tableau 1 : classification des toxiques selon la directive 93/67/EEC.

EC_{50}	Classification
< 0,1 mg/L	extrêmement toxique
0,1 à 1 mg/L	très toxique
1 à 10 mg/L	toxique
10 à 100 mg/L	nuisible
> 100 mg/L	non toxique

Tableau 2 : résultats d'écotoxicité de la carbamazépine sur différents organismes aquatiques.

Organisme	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)
Bactéries	<i>Vibrio fischeri</i>	EC_{50}	64,3
Algues et plantes aquatiques	<i>Chlorella vulgaris</i>	EC_{50}	36,6
Invertébrés	<i>Daphnia magna</i>	EC_{50}	97,8
Poissons	<i>Oryzias latipes</i>	EC_{50}	35,4

D'après INERIS – <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/3001>

Annexe 6 - Détermination de l'IBGN de la rivière en sortie de STEP

Tableau 1 : classement des invertébrés benthiques récoltés en sortie de la STEP.

TAXONS	GI	Nombre d'individus par taxon <u>avant</u> la mise en place de l'ozonation	Nombre d'individus par taxon <u>après</u> la mise en place de l'ozonation
INSECTES			
TRICHOPTERES			
<i>Hydropsychidae</i>	3	53	24
<i>Psychomyidae</i>	4	5	
<i>Sericostomatidae</i>	6	2	12
<i>Uenoidae</i>			5
EPHEMEROPTERES			
<i>Ephemerellidae</i>	3	3	3
<i>Heptageniidae</i>	5	2	4
<i>Isonychiidae</i>			1
<i>Siphonuridae</i>			5
HETEROPTERES			
<i>Aphelocheiridae</i>	3		9
<i>Nepidae</i>			9
<i>Pleidae</i>			7
DIPTERES			
<i>Anthomyidae</i>		4	4
<i>Athericidae</i>			7
<i>Chaoboridae</i>		2	3
<i>Chironomidae</i>	1	1883	1942
<i>Culicidae</i>		3	3
<i>Rhagionidae</i>			74
<i>Simuliidae</i>			26
COLEOPTERES			
<i>Dryopidae</i>			15
<i>Elmidae</i>	2	1	2
<i>Hydraenidae</i>		30	14
<i>Hydrophilidae</i>			19
<i>Psephenidae</i>			6
ODONATES			
<i>Coenagrionidae</i>		2	7
<i>Gomphidae</i>		1	2
<i>Lestidae</i>			1
<i>Platycnemididae</i>		2	1
CRUSTACES			
<i>Asellidae</i>	1	63	54
<i>Atyidae</i>			74
<i>Gammaridae</i>	1	1670	1456
MOLLUSQUES			
<i>Ancylidae</i>		25	25
<i>Bithynidae</i>		2	4
<i>Physidae</i>		6	7
<i>Planorbidae</i>		117	120
VERS			
ANNELIDES		1	1

Tableau 2 : valeurs de l'IBGN selon la nature et la variété taxonomique de la macrofaune - extrait de la norme NF T 90-350.

Taxons	Σt GI	>50	49 45	44 41	40 37	36 33	32 29	28 25	24 21	20 17	16 13	12 10	9 7	6 4	3 1
		<i>Chloroperlidae</i> <i>Perlidae</i> <i>Perlodidae</i> <i>Taeniopterygidae</i>	9	20	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11
<i>Capniidae</i> <i>Brachycentridae</i> <i>Odontoceridae</i> <i>Philopotamidae</i>	8	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8
<i>Leuctridae</i> <i>Glossosomstidae</i> <i>Beraeidae</i> <i>Goeridas</i> <i>Leptophlebiidae</i>	7	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
<i>Nemouridae</i> <i>Lepidostomatidae</i> <i>Sericostomatidae</i> <i>Epheméridae</i>	6	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6
<i>Hydroptilidae</i> <i>Heptageniidae</i> <i>Polymitarcidae</i> <i>Potamanthidae</i>	5	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5
<i>Leptoçeridae</i> <i>Polycentropodidae</i> <i>Psychomyidae</i> <i>Rhyacophilidae</i>	4	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4
<i>Limnephilidae</i> ¹⁾ <i>Hydropsychidae</i> <i>Ephemereilidae</i> ¹⁾ <i>Aphelocheiridae</i>	3	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
<i>Baetidae</i> ¹⁾ <i>Caenidae</i> ¹⁾ <i>Elmidae</i> ¹⁾ <i>Gammaridae</i> ¹⁾ <i>Mollusques</i>	2	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
<i>Chironomidae</i> ¹⁾ <i>Asellidae</i> ¹⁾ Achètes Oligochètes ¹⁾	1	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

1) Taxons représentés par au moins 10 individus - Les autres le sont par au moins 3 individus.

Note pour la détermination de l'IBGN

- déterminer la **variété taxonomique** de l'échantillon (Σt), égale au nombre total de taxons récoltés même s'ils ne sont représentés que par un seul individu ;

- déterminer le **groupe faunistique indicateur (GI)** en ne prenant en compte que les taxons indicateurs, c'est à dire représentés dans l'échantillon par au moins 3 individus ou 10 individus selon les taxons (voir note du tableau 2).

La détermination du GI s'effectue en prospectant l'ordonnée du tableau 2 de haut en bas (GI 9 à GI 1) et en arrêtant l'examen à la première présence significative ($n \geq 3$ individus ou ≥ 10 individus) d'un taxon du répertoire figurant en ordonnée du tableau.

- déduire l'**IBGN** du tableau 2 à partir de son abscisse (Σt) et de son ordonnée (GI). Exemple : si GI = 8 et $\Sigma t = 33$ alors IBGN = 17.