Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

ÉPREUVE E3 – UNITÉ U32
MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2013

_____

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 (Circulaire n°99-186, 16/11/1999)

- Dictionnaire Anglais-Français

Document à rendre et à agrafer avec la copie :

- Document 1 ..... page 5/11

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 11 pages, numérotées de 1/11 à 11/11.

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

DU RAISIN AU VIN :
ÉTUDE DES FLORES MICROBIENNES

Sur le raisin, les micro-organismes trouvent un support et des conditions convenables pour s'installer, se multiplier ou survivre. Cette microflore très variée à la surface des baies va se retrouver brutalement dans le moût de raisin après pressage des grappes.

La vinification se produit spontanément, bien que l'homme actuellement améliore ou oriente ce processus.
Les levures et les bactéries sont les seuls acteurs de la vinification.

1 - Les levures et la fermentation alcoolique (28 points)

1.1 - Caractères généraux des microorganismes (4 points)

Comparer les caractères généraux des levures et des bactéries en remplissant le tableau du **document 1 (à rendre avec la copie).**

1.2 - Taxonomie des levures (19 points)

L'identification des nombreuses espèces de levures sur le raisin a été longtemps réalisée par des tests phénotypiques, et en particulier celle de l'utilisation des glucides.

1.2.1 - Donner la définition générale d'une « espèce » dans le monde vivant. Pourquoi cette définition ne convient-elle pas pour les micro-organismes comme les bactéries et les levures ?

1.2.2 - Préciser ce qu'est un caractère « phénotypique ».

1.2.3 - Le **document 2** est un extrait du tableau « caractéristiques physiologiques des principales espèces de levure du raisin et du vin (Barnett et al, 1990). Le **document 3** indique la composition de deux milieux gélosés utilisés dans l'étude des levures industrielles.

1.2.3.1 - Analyser la **partie T** du tableau ; en déduire une caractéristique nutritionnelle pour la majorité des levures.

1.2.3.2 - Analyser de façon précise la composition (qualitative et quantitative) du milieu B en précisant clairement le rôle des constituants (ces constituants pourront être regroupés de façon judicieuse). Comment peut-on qualifier ce milieu ?

1.2.4 - La composition des milieux A et B est présentée dans le **document 3**.

1.2.4.1 - Qualifier le type respectif de chacun des deux milieux.

1.2.4.2 - Justifier le choix d'un des deux milieux pour :
- la fermentation du glucose,
- l'utilisation du glucose comme seule source de carbone.

1.2.4.3 - Proposer un mode d'utilisation pour chacun de ces milieux (présentation du milieu, ensemencement, incubation et lecture).

1.2.5 - Le **document 4** indique le pourcentage de réassociation ADN-ADN entre quatre espèces du genre *Saccharomyces*, espèces impossibles à différencier les unes des autres par des tests physiologiques.

1.2.5.1 - Quelle information taxonomique nous apportent les résultats du tableau du **document 4** ?

1.2.5.2 - Expliquer le principe du test d'hybridation ADN-ADN.

1.3 - La fermentation alcoolique (5 points)

La fermentation alcoolique dans un premier temps permet la transformation du sucre en éthanol. Elle est assurée par les levures principalement *Saccharomyces cerevisiae*.

Le métabolisme énergétique des levures est à la fois respiratoire et fermentaire, selon les conditions environnementales.

Dans le moût de raisin, on observe que le métabolisme est exclusivement fermentaire, même en conditions aérobies, à cause de l'effet « Crabtree » : une concentration élevée en glucide (≥ 2 g/L) inhibe la respiration.

1.3.1 - Définir un métabolisme fermentaire. Préciser le mécanisme de production d'ATP. Écrire l'équation bilan (sans formule) de la fermentation d'une molécule de fructose.

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

1.3.2 - La production industrielle de levures oenologiques permet d'ensemencer le moût avec des souches connues et performantes.

Cette production se fait à partir de milieux aérés et présentant une concentration en glucide inférieure à 1 g/L. Justifier le choix de ces conditions de production.

2 - La fermentation malolactique et les bactéries lactiques (6 points)

Dans un deuxième temps, la fermentation malolactique liée à l'implantation des bactéries lactiques permet d'améliorer les qualités organoleptiques du vin.

Oenococcus oeni (apparentée au genre *Lactococcus*) est la principale bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique.

2.1 - Présenter les caractéristiques générales des bactéries lactiques et donner trois noms de genre.

2.2 - En fin de fermentation alcoolique, la faible oxygénation favorise le développement de *Oenococcus oeni* : une bactérie anaérobie aérobie tolérante.

Définir l'expression soulignée ; en déduire le métabolisme énergétique de la souche et le caractère peroxydase d'une telle souche.

2.3 - La fermentation malolactique s'écrit

$$HOOC - CHOH - CH_2 - COOH \rightarrow HOOC - CHOH - CH_3 + CO_2$$

Nommer les molécules mises en jeu ; proposer un intérêt de cette fermentation lors de la vinification.

3 - Les flores d'altération de la vinification (26 points)

3.1 - Les bactéries acétiques (3 points)

Certaines espèces présentes dans le moût parviennent à s'implanter et à provoquer des altérations. C'est le cas des bactéries acétiques et de certaines espèces de levure.

Les bactéries acétiques appartiennent aux genres *Gluconobacter* et *Acetobacter* ; ce sont de petits bacilles Gram négatifs, aérobies stricts. Elles produisent de l'acide acétique (appelé officiellement acide éthanoïque) à l'origine de la piqûre acétique des vins.

3.1.1 - Dans ce contexte, comment peut-on qualifier la flore acétique ?

3.1.2 - À partir de l'analyse du tableau du **document 5**, en déduire le métabolisme énergétique des bactéries acétiques et préciser la nature des molécules chimiques mises en jeu.

3.2 - Les levures d'altération (10 points)

De nombreuses espèces de levures perturbent les processus de productions du vin, notamment les espèces :

- *Brettanomyces bruxellensis* : à l'origine d'odeurs désagréables (odeurs animale, de bois mouillé, de fumée). Cette levure est naturellement présente sur les baies de raisin, source importante de contamination.

- *Kluyveromyces phaffii* : espèce « killer » caractérisée par la libération de substances toxiques responsables de la mort de souches d'intérêt œnologique.

On se propose d'étudier un milieu de culture mis au point et les conditions de croissance de la souche afin d'optimiser sa détection au laboratoire. Le **document 6** indique la composition du milieu liquide EBB qui permet la mise en culture directement des baies de raisin.

3.2.1 - Analyser le milieu. Justifier sa composition.

3.2.2 - Afin de vérifier l'efficacité du milieu de culture, on réalise des co-cultures de plusieurs souches de levures dont quatre souches de *B. bruxellensis* **(document 7)** que l'on trouve naturellement sur les baies. On obtient les tracés présentés dans le **document 8**.

Nommer et définir la méthode de culture en fermenteur utilisée lors de cette expérimentation **(document 7)**.

3.2.3 - Les tracés montrent une phase de latence **(document 8)**. À quoi correspond physiologiquement cette phase ?

3.2.4 - Définir et calculer la vitesse spécifique de croissance de *B. bruxellensis* I.

3.2.5 - À partir de l'analyse des tracés **(document 8)** :

- le milieu EBB semble-t-il approprié à l'enrichissement de la souche *B. bruxellensis* ? Justifier.

- quelle est la durée de culture la plus propice à la détection de *B. bruxellensis* ? Justifier.

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

3.3 - Recherche et caractérisation de levures « killer » (13 points)

On se propose d'analyser une procédure de mise en évidence de l'activité « Killer » (production de la toxine KpKt) de *Kluyveromyces phaffii*. Le **document 9** présente le test.

3.3.1 - Construire un diagramme présentant le déroulement du test.

3.3.2 - Quels témoins peut-on réaliser afin de valider ce test ?

On cherche à comparer la toxicité de deux toxines. Pour cela on réalise des mesures de viabilité d'une culture calibrée d'une levure sensible mise en contact avec deux toxines (K1 et KpKt) par cytofluorométrie après marquage à l'Iodure de Propidium (PI) qui se fixe sur l'ADN fragmenté. On obtient les résultats du **document 10**.

3.3.3 - Donner l'intérêt du test « a ». Justifier la réponse.

3.3.4 - Préciser le type de cellules colorées par l'iodure de propidium.

3.3.5 - Analyser les résultats obtenus lors des tests « b » et « c », préciser en le justifiant la toxine qui présente l'effet toxique le plus important.

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

DOCUMENT 1 :

(à rendre avec la copie)

TABLEAU COMPARATIF DE QUELQUES CARACTÈRES DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

	LEVURES	BACTÉRIES
Règne		
Type de cellule		
Modes de reproduction possibles		
Paroi : présence/absence Composants principaux		
Type trophique vis-à-vis de la source de carbone		
Autres caractères distinctifs Stérols : absence/présence		
Taille		

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

DOCUMENT 2 :

CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DES PRINCIPALES ESPÈCES DE LEVURES DU RAISIN ET DU VIN (BARNETT ET AL, 1990)

	C30 Galactitol growth	C31 myo-Inositol growth	C32 D-Glucono-1,5-lactone growth	C33 2-Keto-D-gluconate growth	C34 5-Keto-D-Gluconate growth	C35 D-Gluconate growth	C38 DL-Lactate growth	C39 Succinate growth	C40 Citrate growth	C42 Ethanol growth	N1 Nitrate growth	N2 Nitrite growth	N3 Ethylamine growth	N4 L-Lysine growth	N5 Cadaverine growth	N6 Creatine growth	N7 Creatinine growth	N8 Glucosamine growth	V1 Growth W/O vitamins	V2 Growth W/O myo-inositol	V3 Growth W/O Pantothenate	V4 Growth W/O Biotin	V5 Growth W/O Thiamin	V6 Growth W/O Biotin & Thiamin	V7 Growth W/O Pyridoxine	V8 Growth W/O Pyridoxine & Thiamin	V9 Growth W/O Niacin	T2 Growth at 30°C	T3 Growth at 35°C	T4 Growth at 37°C	T5 Growth at 40°C	01 0,01% Cycloheximide growth	03 1 % Acetic acid growth	074 50 % D-Glucose growth	M2 Acetic acid production	M3 Urea hydrolysis
Candida stellata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	+	-	v	+	v	-	-	-	-	v	-	-
Candida vini	-	-	-	v		-	v	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	v	v	v	+		+	v	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida famata	v	-	v	+		v	v	+	+	+	-	v	+	+	+	v	-	-	v	+	+	v	+	v	+		+	+	v	v	-	v	-	+	-	-
Dekkera anomala	-	-	v	-	-	v	v	v	-	v	v	+	+	+	+	-	-	-	-	v	+	-	-	-	+	-	+	+	+	v	-	+	-	-	+	-
Dekkera bruxellensis	-	-	v	v	-	-	v	-	-	v	v	v	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	v	v	v	+	v	-	+	-
Hanseniaspora uvarum	-	-	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	v	-	-
Metschnikowia pulcherrima	-	-	+	+		+	v	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+		+	v	v	-	-	-	-	v	-	-
Pichia anomala	-	-	+	-	-	v	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	-	-	-	v	-	-
Pichia fermentens	-	-	v	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	v	-	-
Pichia membranefociens	-	-	v	-	-	-	v	v	-	+	-	-	+	+	+	-	-	v	v	+	+	v	v	v	+	v	+	+	v	v	-	-	-	v	-	-
Saccharomyces cerevisiae (*)	-	-	v	-	-	-	v	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	+	+	v	v	v	-	-	v	-	-
Saccharomycodes ludwigii	-	-	v	-	-	-	v	-	-	v	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	v	-	-	-	-	+	+	v	-	-	-	-	-	-
Kluyveromices thermolerens	-	-	v	v	-	v	-	v	-	v	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	v	v	v	v	v		v	+	+	v	-	-	-	+	-	-
Schizosaccharomyces pombe	-	-	v	v	-	v	-	-	-	-	-	-	v	v	v	-	-	-	-	-	v	v	v	-	v	-	-	+	+	+	v	v	+	+	-	+
Zygosaccharomyces bailii	-	-	v	v	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+		+	+	v	v	-	-	+	+	-	-

+ : test positif - : test négatif v : test variable

PARTIE T

(*) ne peut être distingué par ces tests de *S.bayanus, S.paradoxus et S.pastorianus*.

W/O : without

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

DOCUMENT 3 :

MILIEU ET RÉACTIF À DISPOSITION

Milieu A : milieu nutritif W.L. (Wallerstein Laboratories Nutriment medium)

Composition en g/L

a.	Yeast Extract	4	g
b.	Enzymatic Digest of Casein	5	g
c.	D-Glucose	50	g
d.	Monopotassium Phosphate	0.55	g
e.	Potassium Chloride	0.425	g
f.	Calcium Chloride	0.125	g
g.	Magnesium Sulfate	0.125	g
h.	Ferric chloride	0.0025	g
i.	Manganese Sulfate	0.0025	g
j.	Bromcresol Green	0.022	g
k.	Agar	20	g
	pH final : 5.5 ± 0.2 at 25°C		

Milieu B : gélose Yeast Nitrogen Base (YNB) de DIFCO

Composition en g/L

a.	Biotin	2	µg
b.	Calcium pantothenate	400	µg
c.	Folic acid	2	µg
d.	Inositol	2000	µg
e.	Niacin	400	µg
f.	p-Aminobenzoic acid	200	µg
g.	Pyridoxine hydrochloride	400	µg
h.	Riboflavin	200	µg
i.	Thiamine hydrochloride	400	µg
j.	L-Méthionine	20	mg
k.	L-Tryptophane	20	mg
l.	L-Histidine	10	mg
m.	Copper sulfate	40	µg
n.	Potassium iodide	100	µg
o.	Ferric chloride	200	µg
p.	Manganese sulfate	400	µg
q.	Sodium molybdate	200	µg
r.	Zinc sulfate	400	µg
s.	Potassium phosphate monobasic	1	g
t.	Magnesium sulfate	500	mg
u.	Sodium chloride	100	mg
v.	Calcium chloride	100	mg
w.	Ammonium sulfate	2	g
x.	Boric acid	500	µg
y.	Agar	12	g

+ solution de glucide à 10 g/L final

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

DOCUMENT 4 :

POURCENTAGE DE RÉASSOCIATION ADN/ADN ENTRE LES QUATRE ESPÈCES APPARTENANT AU GENRE *SACCHAROMYCES* (VAUGHAN ET MARTINI, 1987)

	S cerevisiae	*S. bayanus*	*S. pastorianus*	*S. paradoxus*
S. cerevisiae	100			
S. bayanus	20	100		
S. pastorianus	58	70	100	
S. paradoxus	53	24	24	100

DOCUMENT 5 :

ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS ET DE LA POPULATION DES BACTÉRIES ACÉTIQUES LORS DU SOUTIRAGE D'UN VIN D'UNE BARRIQUE À UNE AUTRE

	Oxygène dissous (mg/L)	Bactéries acétiques (UFC/mL)
Avant soutirage	0,2	1.10^3
Pendant soutirage	6	-
Après 3 jours	0,8	$1,2.10^4$
Après 20 jours	0,6	2.10^3

NB : Le soutirage consiste au transfert du vin d'une cuve à une autre.

Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau CERTEN

DOCUMENT 6 :

COMPOSITION DU MILIEU EBB, enrichment medium *B.bruxellensis*

commercial grape juice	200 mL/L
ethanol	40 mL/L
malt extract	1.5 g/L
yeast extract	1.5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g/L
$MgSO_4$	0.2 g/L
tween 80	1 mL/ L
Biphenyl	0.02% w/v
chloramphenicol	0.005% w/v

The pH was adjusted to 5.0. The incubation of the berries was carried out at 30°C with slow shaking.

(Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, Vincent Renouf, Aline Lonvaud-Fune, Microbiological Research 162 (2007) 154—167)

DOCUMENT 7 :

LISTE DES SOUCHES UTILISÉES ET PROCÉDÉ DE MISE EN CULTURE

Species
Aureobasidium pullulans
Brettanomyces bruxellensis I
Brettanomyces bruxellensis II
Brettanomyces bruxellensis III
Brettanomyces bruxellensis IV
Cryptococcus alibidus
Rhodosporidum babjevae
Sporidiobolus pararoseus

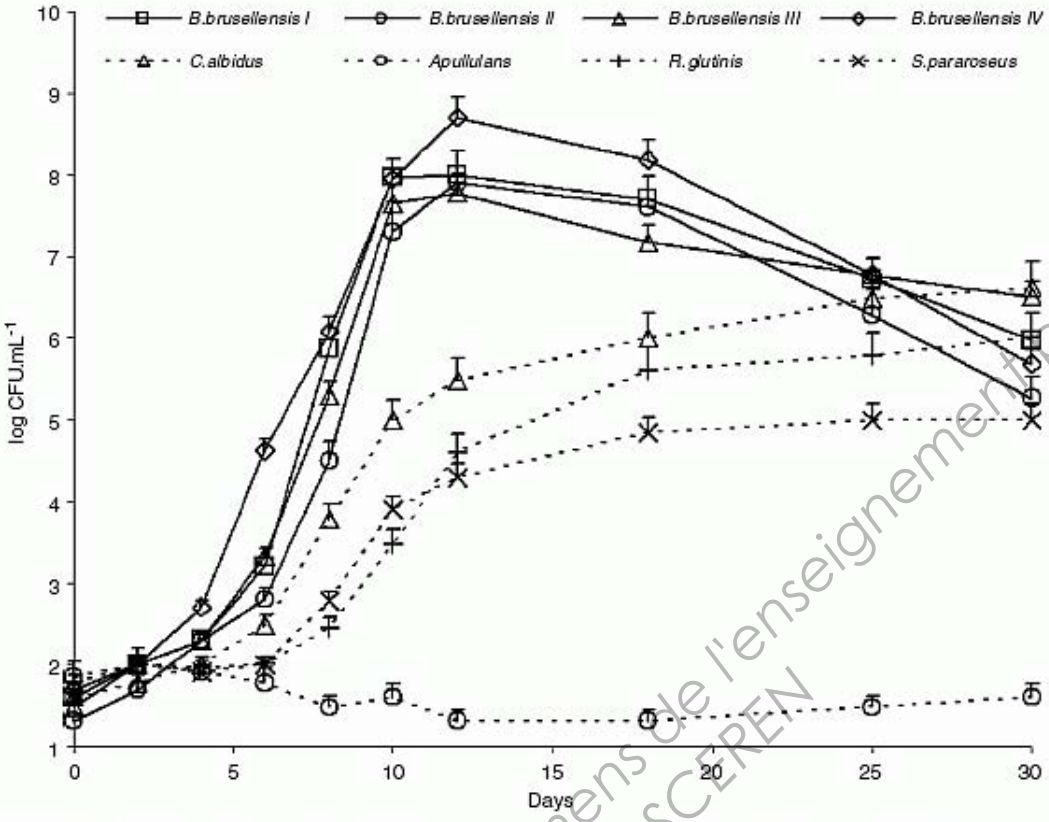
Les fermenteurs sont inoculés selon les directives suivantes :

Appropriate volumes of inoculum were transferred into 125 mL bottles containing 100 m L of the enrichment medium to obtain 10^2 CFU/mL, which was verified by plating aliquots of each strain 3 h after inoculation. The inoculated bottle and the control bottles (without yeast) were incubated and maintained at 30°C with slow shaking.

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

DOCUMENT 8 :

COURBES DE CROISSANCE DE LEVURES EN MILIEU NON RENOUVELÉ



Growth in EBB medium of four *Brettanomyces bruxellensis* strains and four non-*Brettanomyces* species currently found on grapes.

Base nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau SCEREN

DOCUMENT 9 :

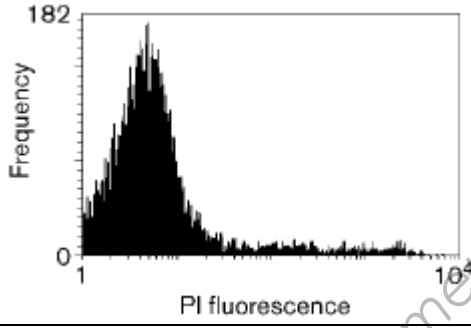
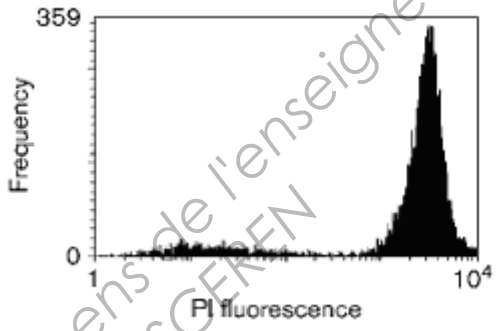
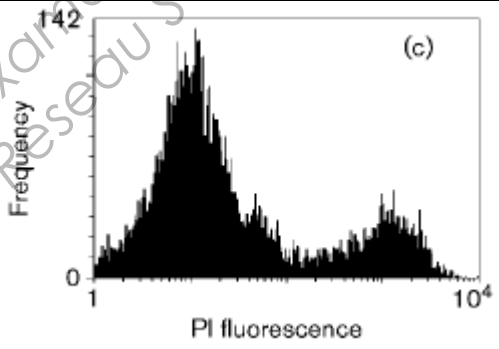
TEST D'ESSAI DE MESURE DE L'ACTIVITÉ KILLER

Killer activity assay and measurement. KpKt activity was determined according to Somers & Bevan (1969). 70 µl toxin samples were filter-sterilized through 0,45 µm pore-size membrane filters (Millipore) and put into wells (7 mm diameter) cut in the malt agar plates that had previously been seeded with 10^5 cells mL^{-1} of a s ensitive indicator strain. The killing activity was measured as the diameter of the inhibition halo around the well after incubation for 72 h at 20 °C, and is defined as the mean zone of inhibition of replicate wells. The linear relationship observed between the logarithm of killer toxin concentration and the diameter of the inhibition halo assayed by this well-test method was used to define KpKt activity in arbitrary units (aU). One aU is defined as the toxin concentration that results in an inhibition halo of 15 mm (actual diameter 8 mm, considering the 7 mm diameter of the well)
One aU corresponds to about 1,0 mg killer protein.

Killer toxin of Kluyveromyces phaffii DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. Ciani, M. & Fatichenti, F. (2001). Appl Environ Microbiol 67, 3058–3063.
Replicate wells : double essai.

DOCUMENT 10 :

RÉSULTATS DU CYTOFLUORIMÈTRE

a) Cells not treated with KpKt or cells not treated with K1	
b) Cells treated with K1 for 8 h.	
c) Cells treated with KpKt for 8 h	

NB : l'axe des abscisses représente l'intensité de fluorescence en unité arbitraire
l'axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules (fréquence statistique)

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

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.