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

CORRIGE

Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.

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

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

Lors de la présentation du sujet par le centre organisateur, on mettra l'accent sur la nouvelle présentation, en particulier l'endroit où se trouvent les questions à traiter sur la copie :
- compte rendu à la fin de chaque fiche protocole
- rapport d'analyse : bilan de l'ensemble du travail effectué (en bas de la page 1)

Pour un groupe de 15 étudiants

Prévoir pour les candidats n'ayant pas réussi leur conception de gamme un document avec la bonne gamme pour qu'ils poursuivent la manipulation (voir exemple tableau de gamme dans « éléments de corrigé et résultats des essais)

PREMIER JOUR

Matériels communs

- Étalons Mac Farland 0,5
- 2 densitomètres (*) de paillasse ou spectrophotomètre réglé à 600 nm + poubelle et sac à autoclave
- Tubes à hémolyse stériles
- Pipettes graduées stériles de 1, 2, 5 et 10 mL
- Huile de paraffine stérile
- Colorants de Gram + réactifs oxydase/catalase

(*) prévoir au poste une fiche d'utilisation de l'appareil.

Solutions à préparer pour l'ensemble de la manipulation

- 500 mL de tampon phosphate stérile pH 7,5 : peser 4,53 g de KH_2PO_4 et 4,73 g de Na_2HPO_4 et dissoudre dans 500 mL d'eau distillée stérile. Vérifier après autoclavage que le pH est compris entre 7 et 8. Ajuster si nécessaire.
  → sert pour les étudiants et pour la préparation des 2 solutions de vitamine B12 ci-dessous.
- 100 mL de solution étalon de vitamine B12 à 5 µg/mL :
  → préparée par dilution au 1/100 à partir d'une ampoule de vitamine B12 commerciale à 500 µg/mL (1 mL de solution de Vit B12 commerciale, qsp 100 mL avec le tampon phosphate stérile pH 7,5) – Ne pas autoclaver.
- 50 mL de solution de vitamine B12 à 2,5 µg/mL :
  → préparée par dilution au 1/2 à partir de la solution précédente à 5 µg/mL (25 mL de solution étalon à 5 µg/mL, qsp 50 mL avec le tampon phosphate stérile pH 7,5) – Ne pas autoclaver.
- 50 mL de solution de vitamine B12 à 1 µg/mL :
  → préparée par dilution au 1/5 à partir de la solution précédente à 5 µg/mL (10 mL de solution étalon à 5 µg/mL, qsp 50 mL avec le tampon phosphate stérile pH 7,5) – Ne pas autoclaver.

Attention : Les solutions de vitamine B12 doivent être préparées le plus extemporairement possible et être stockées à 4°C.

Solutions à préparer pour l'ensemble de la manipulation

→ Milieu minéral exempt de vitamine B12.

→ besoin de 120 mL par étudiant (2 flacons x 60 mL), soit **2 L à préparer** :

Composition pour 1 litre		
	- $(NH_4)_2SO_4$	2 g
	- KH_2PO_4	6 g
	- K_2HPO_4	14 g
	- glucose	10 g
	- agar	15 g
	- eau distillée qsp	1 litre

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

Par étudiant

Matériels et souches

- 1 galerie d'identification pour *Staphylococcus aureus* (ne pas mettre à la vue des étudiants) :
  - 1 VF régénérée et maintenue en surfusion
  - 1 gélose nutritive ordinaire coulée en boîte de Pétri
  - 1 galerie API Staph + medium + fiche de la galerie
- 1 souche d'E.*coli* « **B12** » isolée sur GN en boîte de Pétri
- 2 tubes de 10 mL d'eau physiologique stérile
- 2 boîtes de Pétri carrées 12 x 12 cm
- 1 pipette auto P_{1000} (+ cônes stériles)
- 1 pipette auto P_{200} (+ cônes stériles)
- 1 pipette auto P_{20} (+ cônes stériles)
- 5 tubes Eppendorf stériles de capacité 1,5 mL
- 1 boîte de Pétri contenant 20 disques cartonnés stériles de diamètre 6 mm
- 1 flacon de 12 mL de solution tampon phosphate stérile étiquetée « **Tampon pH 7,5** »
- 1 tube contenant 1 mL de solution de vitamine B12 à 5 µg/mL étiqueté « **Vit B12 5 µg/mL** »
- 1 tube contenant 1 mL d'une solution de vitamine B12 à 2,5 µg/mL étiqueté « **Prélèvement Fed-batch t = 60h** »
- 1 tube contenant 1 mL d'une solution de vitamine B12 à 1 µg/mL étiqueté « **Prélèvement bach t = 60h** »
- 2 flacons de 60 mL de gélose pour dosage microbiologique étiquetée « **Gélose base** » en surfusion à 60°C (pas la même que celle pour VF). Prévoir 2 études (ou bains) différentes pour gélose base et VF.
  → voir paragraphe précédent pour la préparation du milieu
- 1 souche de *Staphylococcus aureus* isolée sur gélose nutritive inclinée étiquetée « **S** »
- 1 tube de 5 mL de souche S.*aureus* en bouillon Mueller Hinton à environ 10^5 UFC/mL étiqueté « **S** »
- 1 tube de 4 mL de solution d'ampicilline à 10 µg/mL notée « **Amp** »
- 12 tubes à hémolyse vides et stériles
- 1 flacon de 20 mL de bouillon Mueller Hinton stérile
- 5 cuves spectrophotométriques
- Parafilm

DEUXIÈME JOUR

Matériels et souches

- Réactifs de lecture pour la galerie API Staph
- 5 ordinateurs portables avec accès Apiweb ou autre logiciel d'identification probabiliste + tableau Excel ou Regressi + imprimante

Matériels par étudiant

- 1 règle de mesure graduée (au ½ mm près)
- 1 fiche de lecture API Staph

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

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

Fiche protocole 1 : Dosage de la vitamine B12 dans des moûts de fermentation

Calcul du volume d'inoculum

La suspension ajustée est à 0,2 u.A à 600 nm, soit une concentration bactérienne (selon la relation de proportionnalité proposée) de $4{,}8 \times 10^7$ *E.coli*/mL

On désire obtenir une concentration d'environ 2×10^6 bactéries par mL dans chaque flacon de 60 mL de gélose base, soit un volume à prélever de : $V_{PE} = (2 \times 10^6 \times 60) / 4{,}8 \times 10^7 = 2{,}5$ mL

Annexe 1 complétée

Volume final à préparer pour chaque dilution

On a besoin de 2 x 10 µL de chaque solution pour réaliser la manipulation. Au regard du matériel disponible (P20, P_{200} et P_{1000}) et des volumes minimaux pipetables avec ce matériel, il faut préparer au moins 50 µL final.

Exemple de tableau de préparation de la gamme d'étalonnage:

Dilution préparée	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
V_{PE} solution B12 à 5 µg/mL (µL)	50	-	-	-	-
Reprise (µL)	-	50	50	50	50
V_{PE} diluant : tampon P (µL)	50	50	50	50	50
Concentration B12 finale (µg/mL)	2,5	1,25	~ 0,63	~ 0,31	~ 0,16

NB : prévoir quelques exemplaires du tableau qui sera fourni aux candidats n'ayant pas réussi la conception de leur gamme.

Composition de la gélose base utilisée

La gélose base est un milieu synthétique. Il est dépourvu de toute source d'extraits animaux ou végétaux afin de ne pas apporter de vitamine B12 : la souche d'*E.coli* B12 (auxotrophe vis-à-vis de ce facteur de croissance) ne pourra donc se développer qu'à partir de la vitamine B12 contenue dans les étalons et les essais.

Temps d'attente avant incubation

Temps de prédiffusion des solutions de vitamine dans le milieu gélosé avant mise en incubation.

Dépôt de tampon phosphate

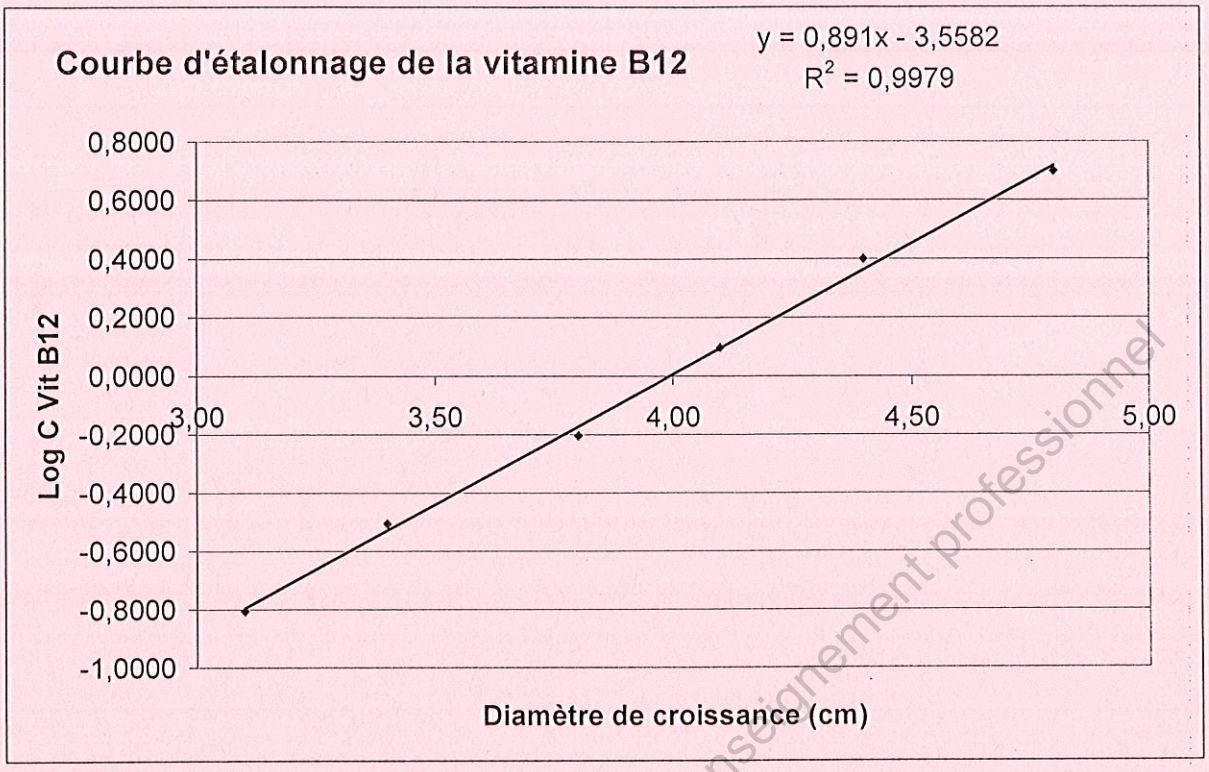
Témoin **« absence de culture »** permettant de vérifier l'auxotrophie de la souche vis-à-vis de la vitamine B12.

Tableau de résultats

C Vit B12 (µg/mL)	d croissance (cm)	log C Vit B12
5,000	4,80	0,6990
2,500	4,40	0,3979
1,250	4,10	0,0969
0,625	3,80	-0,2041
0,313	3,40	-0,5051
0,156	3,10	-0,8062
Essai batch	4,00	-
Essai fed batch	4,40	-

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

Courbe d'étalonnage



Résultats des essais

Calcul de C vitB12 dans les essais (par calcul mathématique à l'aide de l'équation sous Excel ou bien par report graphique sous Regressi) :

→ Concentration essai batch = 1 µg/mL

→ Concentration essai fed-batch = 2,5 µg/mL

Calcul de productivité volumique horaire et conclusion

Temps de culture = 60h
Concentration essai batch = 1 µg/mL = 1000 µg/L → productivité = 1000/60 = 16,7 µg/L/h
Concentration essai fed-batch = 2,5 µg/mL = 2500 µg/L → productivité = 2500/60 = 41,7 µg/L/h

→ le procédé fed-batch permet d'obtenir un meilleur rendement de production.

Fiche protocole 2 : Identification de la souche bactérienne contaminant les moûts de fermentation

- Examen macroscopique sur GNi → colonies rondes, d'environ 1-2 mm de diamètre, lisses, brillantes, de couleur crème (type S).

- Coloration de Gram → coques Gram + isolés, en amas et « grappes de raisin ».

-Test enzymatique → catalase +.

- Orientation J1 → genre *Staphylococcus* ou *Micrococcus* et apparentés.

- Proposition de galerie adaptée :
  pour vérifier le genre : VF pour vérification du type respiratoire AAF,
  pour déterminer l'espèce : galerie Bio-Mérieux API Staph + GN pour contrôle de pureté.

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

Fiche protocole 3 : Détermination de la CMI vis-à-vis de la souche « S »

Préparation du témoin

On préparera un témoin de culture permettant de vérifier le bon développement de la souche dans le bouillon Mueller Hinton.

Composition : 1 mL de bouillon MH + 1 mL d'inoculum.

Gamme

Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
V_{PE} amp. à 10 µg/mL (mL)	1							
V reprise (mL)	-	1	1	1	1	1	1	1
V bouillon MH (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
V inoculum (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
C ampicilline (µg/mL)	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039

Résultats des essais

C ampicilline (µg/mL)	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039
Culture	-	-	-	-	+	+	+	+

→ La CMI de la souche « S » vis-à-vis de l'ampicilline est **0,625 ≥ CMI > 0,313 µg/mL**

L'ajout d'une concentration d'ampicilline à la concentration de 0,625 µg/mL dans les milieux de fermentation permettrait de préserver les cultures de ce contaminant.

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

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.