

Annexe J6. E6 proposition de sujet zéro

Brevet de Technicien Supérieur **Biotechnologie en recherche et en production** Session 2026

E6 - Expertise technologique pour la recherche au laboratoire de biotechnologie **Contrôle en Cours de Formation** « sujet zéro »

Durée totale : 10 heures

Coefficient : 6

Épreuve en trois parties – J1 : 3h30 – J2 : 2h30 – J3 : 4h

Lycée des Biotechnologies, EDUCVILLE

Matériel autorisé

- Dictionnaire anglais/français.
- Cahiers de laboratoire utilisés dans le cadre de la formation.
- Calculatrice, en conformité avec la réglementation en vigueur

Deux copies sont à rendre par le candidat pour chacune des trois parties :

- une première copie pour les « questionnements associés à l'activité professionnelle », **Qx**.
- une deuxième copie « cahier de laboratoire » pour la traçabilité et l'exploitation des résultats, à insérer dans la copie précédente.

→ Les copies rendues ne sont plus accessibles pour traiter les parties suivantes.

Barème

	Compétences évaluées	Points
C2.1	Maîtriser les outils numériques appliqués aux biotechnologies	3
C2.2	Anticiper la réalisation d'une expérience de recherche	2
C2.3	Réaliser des techniques de biotechnologie moléculaire en laboratoire de recherche	3
C2.4	Réaliser des techniques de biotechnologie cellulaire procaryote et eucaryote en laboratoire de recherche	7
C2.5	Assurer la traçabilité des informations utiles aux activités de recherche	2
C2.6	Analyser les données expérimentales dans le contexte d'une problématique de recherche	3

PARTIE 1 (3h30)

Le 11 mai 2026 de 9h à 12h30

Activités de recherche au laboratoire d'écotoxicologie

***Chlorella vulgaris*, modèle d'étude de l'efficacité de la biodégradation des pesticides organophosphorés**

Le laboratoire d'écotoxicologie étudie les processus de bioremédiation des sols contaminés par des pesticides organophosphorés. L'enzyme *organophosphorus hydrolase* (OPH), issue de souches du genre *Bacillus*, apparaît comme molécule candidate pour de nouvelles stratégies de décontamination.

Dans le cadre de cette approche de dépollution, le laboratoire envisage d'analyser l'efficacité de l'OPH pour la biodégradation de pesticides. Pour évaluer cet effet, il cherche à établir un modèle d'étude dont la croissance serait ralentie en présence d'un pesticide et qui serait rétablie en présence de l'OPH. Le premier de modèle d'étude s'intéresse à la microalgue, *Chlorella vulgaris*. Le pesticide choisi est le chlorpyrifos.

Les activités professionnelles (AP) à mettre en œuvre sont les suivantes :

- **AP1. Préparation et contrôle qualité d'une préculture de *Chlorella vulgaris***
- **AP2. Étalonnage de la méthode de suivi de croissance par turbidimétrie**

AP1. Préparation et contrôle qualité d'une préculture de *Chlorella vulgaris*

Le laboratoire d'écotoxicologie travaille sur la dépollution de milieux contaminés par des pesticides organophosphorés. Il souhaite étudier l'effet du chlorpyrifos sur la croissance de la microalgue *Chlorella vulgaris*.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Décongeler de l'échantillon de *Chlorella vulgaris* stocké par cryoconservation à - 80°C ;
- Préparer la préculture en milieu BG11 de l'échantillon *Chlorella vulgaris* décongelé ;
- Contrôler la pureté microbiologique de la préculture par ensemencement d'une gélose Sabouraud et d'une gélose Trypticase Soja ;
- Déterminer le pourcentage de viabilité et la concentration cellulaire par numération en cellule de Malassez en présence d'un colorant de viabilité.

Traçabilité et exploitation des résultats

Reporter sur la copie « cahier de laboratoire » :

- Les données du travail préparatoire à la manipulation ;
- Les résultats expérimentaux ;
- L'exploitation des résultats incluant l'analyse et la conclusion en lien avec le contexte de l'activité professionnelle.

Matériel d'étude :

- Milieu de culture BG11 stérile, noté « BG11 »
- Gélose Trypticase Soja, notée « TS »
- Gélose Sabouraud, notée « SAB »
- Échantillon de *Chlorella vulgaris* conservé à - 80 °C, noté « *C. vulgaris* »

Documents :

- Fiche technique 1- Décongélation de microalgues et préparation de la pré-culture
- Fiche technique 2- Recherche de contaminants dans la pré-culture
- Fiche technique 3- Numération et test de viabilité en cellule de Malassez
- Annexe 1 : Composition et préparation du milieu BG11
- Fournis par le centre :
 - Planning utilisation du PSM (à disposition à côté du PSM)
 - Fiche technique : numération en cellule de Malassez
 - Aide-mémoire de métrologie

Information aux candidats :

- Vérifier l'accessibilité au PSM et réserver une plage d'accès en complétant le planning d'utilisation.
- Montrer à l'examineur une unité de comptage et le résultat de la numération correspondante.

Questionnements associés à l'activité professionnelle

Q1. Argumenter la réalisation d'un test de viabilité lors d'une étape de décongélation d'échantillons biologiques.

Q2. Expliquer le mécanisme d'action du bleu de Funk pour évaluer la viabilité cellulaire.

Q3. À partir du principe de fonctionnement d'un poste de sécurité microbiologique, expliquer comment ce dispositif permet la protection de l'échantillon manipulé.

Q4. Citer trois bonnes pratiques à respecter garantissant la stérilité lors d'une manipulation sous PSM.

L'annexe 1 présente la composition et la préparation du milieu BG11.

Q5. Argumenter le type trophique de la microalgue à partir des conditions de culture.

AP2. Étalonnage de la méthode de suivi de croissance de *Chlorella vulgaris* par turbidimétrie

Chlorella vulgaris est une microalgue unicellulaire photosynthétique facile à cultiver. Pour suivre la croissance par de *Chlorella vulgaris* par turbidimétrie, il est nécessaire de déterminer la zone de linéarité et de d'établir la relation entre l'atténuation à 750 nm et la concentration en nombre de cellules.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Réaliser une gamme de dilution de raison 2, à partir d'une suspension de concentration exacte connue en nombre de *Chlorella* (suspension étalon), puis effectuer la mesure d'atténuation de cette gamme à 750 nm.
- Déterminer la limite de linéarité et la relation entre l'atténuation 750 nm et la concentration en nombre de cellules.

Traçabilité et exploitation des résultats

Reporter sur la copie « cahier de laboratoire » :

- Les données du travail préparatoire à la manipulation ;
- Les résultats expérimentaux ;
- L'exploitation des résultats incluant l'analyse et la conclusion en lien avec le contexte de l'activité professionnelle.

Matériel d'étude :

- Suspension étalon en eau physiologique "*Chlorella vulgaris*" notée "Cv" de concentration égale à 10^7 cellules · mL⁻¹

Documents :

- Fiche technique 4 : Préparation du suivi de croissance par turbidimétrie
- Notice d'utilisation du spectrophotomètre (fournie par le centre)

Questionnement associé à l'activité professionnelle

Q6. Argumenter le choix de la turbidimétrie pour un suivi de croissance.

Ressources documentaires : fiches techniques et annexes

Sommaire

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique 1	Décongélation de microalgues et préparation de la pré-culture	Page 6
Fiche technique 2	Recherche de contaminants dans la pré-culture	Page 7
Fiche technique 3	Test de viabilité en cellule de Malassez	Page 8
Fiche technique 4	Détermination de la correspondance entre l'atténuation et la concentration en nombre de cellules	Page 9

ANNEXES

ANNEXE 1	Composition et préparation du milieu BG11	Page 10
----------	---	---------

DOCUMENTS FOURNIS PAR LE CENTRE

- Planning utilisation du PSM
- Fiche technique du centre : numération en cellule de Malassez
- Notice d'utilisation du spectrophotomètre
- Aide-mémoire de métrologie

Les microalgues peuvent être conservées à - 80 °C par cryoconservation, en présence d'agents cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Afin d'assurer la viabilité cellulaire, la décongélation doit être rapide à 37 °C, et suivie immédiatement d'un ensemencement dans un milieu de culture approprié.

Un pourcentage de viabilité supérieur à 60 % est considéré comme acceptable.

Une concentration cellulaire de la préculture supérieure à 5.10^5 cellules · mL⁻¹ est considéré comme acceptable.

1. Matériels et réactifs

- PSM
- Enceinte climatique
- Bain-marie à 37 °C
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger stériles
- Agitateur
- Erlenmeyer stérile
- Échantillon à décongeler (cryotube conservé à - 80 °C)
- Milieu de culture BG11 stérile

2. Décongélation de l'échantillon de microalgues et ensemencement de la pré-culture

- Placer le cryotube au bain marie à 37 °C pendant environ 1 min, jusqu'à décongélation. Agiter.
- Verser 10 mL de milieu de culture BG11 dans un tube à centrifuger.
- Verser le contenu du cryotube délicatement à la surface du milieu sans mélanger.
- Centrifuger 5 min à 2500 tr/min.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot cellulaire dans 5 mL de milieu de culture.
- Transférer l'inoculum dans 15 mL de milieu de culture en erlenmeyer stérile.
- Prélever un aliquot de la préculture pour le contrôle qualité en vue, d'une numération en cellule de Malassez, d'un test de viabilité et d'un test de pureté.
- Incuber la préculture pendant 72 h en conditions contrôlées standardisées : 25 °C, éclairage constant (2000 Lux), sous agitation à 130 rpm ;

Fiche technique 2- Recherche de contaminants dans la pré-culture

Le contrôle microbiologique des pré-cultures nécessite la recherche de contaminants par l'ensemencement de géloses appropriées :

- la gélose Trypticase Soja pour la recherche de contaminants bactériens ;
- la gélose Sabouraud pour la recherche de contaminants fongiques.

1. Matériels et réactifs

- | | |
|-----------------------------|--|
| - Bec électrique | - Aliquot de préculture |
| - Étuves à 37 °C et à 30 °C | - Gélose Trypticase Soja, notée « TS » |
| - Pipette pasteur boutonnée | - Gélose Sabouraud, notée « SAB » |

2. Mode opératoire

- Ensemencer une gélose Trypticase Soja « TS » et Sabouraud « SAB »
- Incuber les géloses : « TS » 24h à 37 °C et « SAB » 48h à 30 °C.

Fiche technique 3- Test de viabilité en cellule de Malassez

Le test de viabilité utilisant le bleu de Funk est couramment utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire lors d'une numération en cellule de Malassez. Ce test permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

1. Matériels et réactifs

- Cellule de Malassez
- Lamelle (22x22mm)
- Compteur de cellules
- Centrifugeuse
- Tubes à centrifuger stériles
- Microscope
- Aliquot de préculture de la fiche technique 1
- Bleu de Funk à 0,2 %

2. Mode opératoire

- Introduire dans un microtube :
 - 450 µL de suspension de pré-culture de la microalgue
 - 50 µL de bleu de Funk à 0,2 %
- Incuber 10 minutes puis centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 500 µL de milieu de culture.
- Effectuer la numération en cellule de Malassez des cellules vivantes et mortes. Réaliser la numération sur deux essais en condition de répétabilité.

Données métrologiques :

$$s_r = 1,2 \cdot 10^5 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u_c = 0,2 \cdot 10^6 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Fiche technique 4- Détermination de la correspondance entre l'atténuation et la concentration en nombre de cellules

1. Matériels et réactifs

- Cellule de Malassez
- Compteur de cellules
- Tubes à hémolyse
- Spectrophotomètres
- Cuves
- Pipettes stériles de 1 mL
- Propipette
- Ordinateur
- Suspension étalon de microalgues en eau physiologique
- Diluant : eau physiologique

2. Réalisation d'une gamme d'étalonnage

- A partir d'une Suspension étalon de microalgues, réaliser une gamme de 5 dilutions en série, de raison 2, en eau physiologique.
- Mesurer l'atténuation à 750 nm contre un blanc approprié.

3. Exploitation des résultats

- Tracer en utilisant un outil tableur numérique, le graphique : : $D_{750 \text{ nm}} = f(C_{N(\text{cellules ; suspension})})$.
- Repérer la zone de linéarité.
- Déterminer l'équation de la droite correspondant la zone de linéarité.

Donnée : $C_{N(\text{cellules ; suspension})}$ est exprimée en *nombre de cellules* · mL⁻¹.

Annexe 1- Composition et préparation du milieu BG11

N°	9 solutions stocks	Concentration (g·L ⁻¹)
1	NaNO ₃	15
2	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6
5	Acide citrique	0,6
6	Ammonium ferric citrate	0,6
7	EDTA (disodique, Mg ²⁺)	0,1
8	Na ₂ CO ₃	2
9	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,08

Préparation d'un litre de milieu BG11	
N° solutions stocks	Volume (mL)
1	100
2	10
3	10
4	10
5	10
6	10
7	10
8	10
9	1
QSP 1 L pH 7,1 Autoclaver	

Source : http://www.perrin33.com/microbiologie/metabolismes/analysmilieu_3.php

Brevet de Technicien Supérieur
Biotechnologie en recherche et en production
Session 2026

**E6 - Expertise technologique pour la recherche
au laboratoire de biotechnologie**

Contrôle en Cours de Formation
« sujet zero »

Durée totale : 10 heures

Coefficient : 6

Epreuve en trois parties – J1 : 3h30 – J2 : 2h30 – J3 : 4h

Lycée des Biotechnologies, EDUCVILLE

Matériel autorisé

- Dictionnaire anglais/français.
- Cahiers de laboratoire utilisés dans le cadre de la formation.
- Calculatrice, en conformité avec la réglementation en vigueur

Deux copies sont à rendre par le candidat pour chacune des trois parties :

- une première copie pour les « questionnements associés à l'activité professionnelle », **Qx**.
- une deuxième copie « cahier de laboratoire » pour la traçabilité et l'exploitation des résultats, à insérer dans la copie précédente.

→ Les copies rendues ne sont plus accessibles pour traiter les parties suivantes.

Barème

	Compétences évaluées	Points
C2.1	Maîtriser les outils numériques appliqués aux biotechnologies	3
C2.2	Anticiper la réalisation d'une expérience de recherche	2
C2.3	Réaliser des techniques de biotechnologie moléculaire en laboratoire de recherche	3
C2.4	Réaliser des techniques de biotechnologie cellulaire procaryote et eucaryote en laboratoire de recherche	7
C2.5	Assurer la traçabilité des informations utiles aux activités de recherche	2
C2.6	Analyser les données expérimentales dans le contexte d'une problématique de recherche	3

PARTIE 2 (2h30)

Le 12 mai 2026 de 14h à 16h30

Activités de recherche au laboratoire d'écotoxicologie

***Chlorella vulgaris*, modèle d'étude de l'efficacité de la biodégradation des pesticides organophosphorés**

Le laboratoire d'écotoxicologie étudie les processus de bioremédiation des sols contaminés par des pesticides organophosphorés. L'enzyme *organophosphorus hydrolase* (OPH), issue de souches du genre *Bacillus*, apparaît comme molécule candidate pour de nouvelles stratégies de décontamination.

Dans le cadre de cette approche de dépollution, le laboratoire envisage d'analyser l'efficacité de l'OPH pour la biodégradation de pesticides. Pour évaluer cet effet, il cherche à établir un modèle d'étude dont la croissance serait ralentie en présence d'un pesticide et qui serait rétablie en présence de l'OPH. Le premier de modèle d'étude s'intéresse à la microalgue, *Chlorella vulgaris*. Le pesticide choisi est le chlorpyrifos.

Les activités professionnelles (AP) à mettre en œuvre sont les suivantes :

- **AP1. Préparation et contrôle qualité d'une préculture de *Chlorella vulgaris* (jour 2)**
- **AP3. Étude de la croissance de la microalgue modèle, *Chlorella vulgaris*, en présence et absence de chlorpyrifos**

AP1. Préparation et contrôle qualité d'une préculture de *Chlorella vulgaris* (Jour 2)

Le laboratoire d'écotoxicologie travaille sur la dépollution de milieux contaminés par des pesticides organophosphorés. Il souhaite vérifier la pureté de la préculture de la microalgue *Chlorella vulgaris* en vue d'étudier sa croissance.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Valider la qualité microbiologique de la pré-culture en effectuant la lecture des milieux Trypticase Soja « TS » et Sabouraud « Sab » après incubation.

Traçabilité et exploitation des résultats

Reporter sur la fiche « cahier de laboratoire » :

- Les résultats expérimentaux ;
- L'exploitation des résultats incluant l'analyse et la conclusion en lien avec le contexte de l'activité professionnelle.

AP3. Étude de la croissance de la microalgue modèle, *Chlorella vulgaris*, en présence et absence de chlorpyrifos

Dans le cadre de la construction du modèle d'étude envisagé, le laboratoire étudie l'effet du pesticide chlorpyrifos sur la croissance de la microalgue *Chlorella vulgaris*.

Des cultures de *Chlorella vulgaris* sont lancées chaque semaine en présence ou en absence du pesticide. Le suivi des cultures lancées la semaine précédente (semaine 1) est presque terminé. Les résultats obtenus ont été consignés dans le cahier de laboratoire.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Mettre en œuvre deux suivis de croissance de *Chlorella vulgaris* correspondant au J0 de la semaine 2, aux conditions suivantes :
 - une croissance témoin sans pesticide : « Témoin de culture sans pesticides » ;
 - une croissance essai en présence de chlorpyrifos à une concentration en masse de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$: « Essai avec pesticide ».
- Réaliser les prélèvements correspondant au J5 (120 h) de la semaine 1, selon les deux conditions de culture.
- Déterminer les paramètres de croissance de la microalgue *Chlorella vulgaris* en présence et en absence de pesticide organophosphoré pour les suivis de croissance de la semaine 1.
- Analyser et conclure sur l'effet du pesticide sur la croissance de la microalgue.
- Valider le modèle d'étude permettant d'analyser la biodégradation des pesticides par l'OPH.

Traçabilité et exploitation des résultats

Reporter sur la fiche « cahier de laboratoire » :

- Les données du travail préparatoire à la manipulation ;
- Les résultats expérimentaux ;
- L'exploitation des résultats incluant l'analyse et la conclusion en lien avec le contexte de l'activité professionnelle.

Matériel d'étude :

- Milieu de culture BG11 stérile, noté « BG11 »
- Solution mère de chlorpyrifos 10X, p (Chlorpyrifos ; Solution mère) = 50 mg · L⁻¹
- Préculture de trois jours de *C. vulgaris* (**AP1**)
- Cultures à J5 de *C. vulgaris* en présence et en absence de chlorpyrifos

Documents :

- Fiche technique 4 : Suivi de croissance de microalgues par turbidimétrie
- Annexe 2 : Extrait du cahier de laboratoire de la semaine 1 - Résultats de suivi de croissance de *Chlorella vulgaris*.
- Fournis par le centre :
 - o Planning utilisation du PSM (à disposition à côté du PSM)
 - o Notice d'utilisation du spectrophotomètre

Information aux candidats :

- Vérifier l'accessibilité au PSM et réserver une plage d'accès en complétant le planning d'utilisation

Sommaire

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique 4	Suivi de croissance de microalgues par turbidimétrie	Page 6
-------------------	--	--------

ANNEXES

ANNEXE 2	Résultats de suivi de croissance de <i>Chlorella vulgaris</i> en présence ou absence de chlorpyrifos	Page 8
----------	--	--------

DOCUMENTS FOURNIS PAR LE CENTRE

- Planning utilisation du PSM
- Notice d'utilisation du spectrophotomètre

Le suivi de croissance d'une culture de microalgues est réalisé pendant 5 jours à intervalles réguliers par mesure de l'atténuation à 750 nm en présence et en absence de pesticide.

1. Matériels et réactifs

- PSM
- Enceinte climatique
- Spectrophotomètre
- Cuves visibles
- Erlenmeyers stériles
- Agitateur
- Préculture de microalgues
- Milieu de culture BG11 stérile

2. Mode opératoire

2.1. Préparation du milieu de culture

- Verser dans un Erlenmeyer de culture, 20 mL milieu de culture BG11 (éventuellement additionné d'une molécule à étudier : facteur de croissance, pesticide, substrat ...)

2.2. Lancement de la culture

- Ensemencer le milieu de culture BG11 à 10% v/v à partir d'une pré-culture pure de 72 h en BG11.
- Prélever un aliquot de la culture ensemencée à J0 pour mesurer l'atténuation initiale.
- Incuber la culture de microalgues, sous agitation à 130 rpm, en présence d'une luminosité constante à 2000 Lux et à une température d'incubation de 25 °C.

2.3. Suivi de croissance

- Réaliser un prélèvement de la culture toute les 12 h.
- Mesurer l'atténuation à 750 nm.

3. Exploitation des résultats dans le cadre de la détermination des paramètres cinétiques

- Calculer la concentration cellulaire pour chaque prélèvement.

Données : pour $D_{750\text{ nm}} = 1$ alors $C_N \text{ (cellules ; suspension)} = 2.10^6 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$.

- Traiter les valeurs expérimentales à l'aide d'un tableur numérique pour déterminer les paramètres de croissance en présence et en absence de pesticide organophosphoré.

Résultats de suivi de croissance de *Chlorella vulgaris*

Temps (h)	0	12	24	36	48	60	72	84	96	120
C_N culture témoin (cellules·mL ⁻¹)	6,0.10 ⁵	6,6.10 ⁵	1,2.10 ⁶	1,8.10 ⁶	3,6.10 ⁶	5,4.10 ⁶	7,5.10 ⁶	8,4.10 ⁶	9,0.10 ⁶	...
C_N essai à 5 mg·L ⁻¹ de chlorpyrifos (cellules·mL ⁻¹)	6.3.10 ⁵	6,6.10 ⁵	8,4.10 ⁵	1,1.10 ⁶	1,6.10 ⁶	1,9.10 ⁶	2,3.10 ⁶	2,7.10 ⁶	3,0.10 ⁶	...

Brevet de Technicien Supérieur
Biotechnologie en recherche et en production
Session 2026

**E6 - Expertise technologique pour la recherche
au laboratoire de biotechnologie**

Contrôle en Cours de Formation
« sujet zero »

Durée totale : 10 heures

Coefficient : 6

Epreuve en trois parties – J1 : 3h30 – J2 : 2h30 – J3 : 4h

Lycée des Biotechnologies, EDUCVILLE

Matériel autorisé

- Dictionnaire anglais/français.
- Cahiers de laboratoire utilisés dans le cadre de la formation.
- Calculatrice, en conformité avec la réglementation en vigueur

Deux copies sont à rendre par le candidat pour chacune des trois parties :

- une première copie pour les « questionnements associés à l'activité professionnelle », **Qx**.
- une deuxième copie « cahier de laboratoire » pour la traçabilité et l'exploitation des résultats, à insérer dans la copie précédente.

→ Les copies rendues ne sont plus accessibles pour traiter les parties suivantes.

Barème

	Compétences évaluées	Points
C2.1	Maîtriser les outils numériques appliqués aux biotechnologies	3
C2.2	Anticiper la réalisation d'une expérience de recherche	2
C2.3	Réaliser des techniques de biotechnologie moléculaire en laboratoire de recherche	3
C2.4	Réaliser des techniques de biotechnologie cellulaire procaryote et eucaryote en laboratoire de recherche	7
C2.5	Assurer la traçabilité des informations utiles aux activités de recherche	2
C2.6	Analyser les données expérimentales dans le contexte d'une problématique de recherche	3

PARTIE 3 (4h)

Le 13 mai 2026 de 9h à 13h00

Activités de recherche au laboratoire d'écotoxicologie

***Chlorella vulgaris*, modèle d'étude de l'efficacité de la biodégradation des pesticides organophosphorés**

Le laboratoire d'écotoxicologie étudie les processus de bioremédiation des sols contaminés par des pesticides organophosphorés. L'enzyme *organophosphorus hydrolase* (OPH), issue de souches du genre *Bacillus*, apparaît comme molécule candidate pour de nouvelles stratégies de décontamination.

Dans le cadre de cette approche de dépollution, le laboratoire envisage d'analyser la capacité de biodégradation de pesticides par l'OPH. Pour mesurer son effet, il cherche à établir un modèle d'étude dont la croissance est ralentie en présence d'un pesticide, le chlorpyrifos, et qui pourrait être rétablie en présence de l'OPH. Le premier test de modèle d'étude porte sur la microalgue, *Chlorella vulgaris*.

Les activités professionnelles (AP) à mettre en œuvre sont les suivantes :

- **AP4. Recherche de souches bactériennes productrices d'OPH**
- **AP5. Vérification du genre *Bacillus* et détermination du pH optimum de l'OPH**

AP4. Recherche de souches bactériennes productrices d'OPH

Le laboratoire a répondu à un appel à projet pour rechercher de nouvelles souches productrices d'OPH.

Il cherche à mettre au point un protocole permettant de récupérer des souches bactériennes issues d'un sol pollué par le pesticide organophosphoré, le diazinon, dans le but de les sélectionner. Les souches seront ensuite testées par PCR pour cribler celles qui possèdent le gène codant l'OPH.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Synthétiser sous forme d'un diagramme la partie « Matériel et méthode » de l'article présenté dans l'**annexe 3** en faisant apparaître les étapes du protocole de criblage de souches capables de dégrader le diazinon.
- Concevoir par analyse bio-informatique, le couple d'amorces permettant de détecter par PCR le gène codant l'OPH.

Traçabilité et exploitation des résultats

- Les données du travail préparatoire à la manipulation.
- Reporter sur le **fichier numérique** « cahier de laboratoire » les copies d'écran pour rendre compte de la démarche de conception du couple d'amorces.

Outil numérique :

- Ordinateur avec accès internet

Documents :

- Fiche technique 5 : Sélection d'un couple d'amorces en vue de la réalisation d'une PCR
- Annexe 3 : Extrait d'un article scientifique

Questionnements associés à l'activité professionnelle

La **fiche technique 5** présente la démarche de conception d'un couple d'amorces.

Q7. Distinguer les critères permettant d'assurer la spécificité, la stabilité et la compatibilité des amorces à sélectionner. Argumenter la réponse.

AP5. Vérification du genre *Bacillus* et détermination du pH optimum de l'OPH

Pour les besoins d'un article scientifique, un doctorant demande au technicien de déterminer le pH optimal de l'OPH produite par une souche candidate de *Bacillus*, issue du criblage effectué en **AP4**.

Les tâches à réaliser sont les suivantes

- Vérifier l'appartenance au genre *Bacillus* en effectuant une coloration de Gram et un test enzymatique d'orientation.
- Construire un tableau de manipulation pour la détermination par méthode deux points à différents pH. Cette détermination nécessite la réalisation de blancs réactifs.
- Déterminer le pH optimal de l'enzyme OPH par méthode enzymatique en deux points à différents pH.

Traçabilité et exploitation des résultats

Reporter sur le « cahier de laboratoire » :

- Les données de traçabilité du travail préparatoire à la manipulation
- Les résultats expérimentaux
- L'exploitation des résultats incluant l'analyse et la conclusion en lien avec le contexte de l'activité professionnelle

Matériel d'étude et réactifs :

- Souche isolée sur GTS noté « souche OPH »
- Différentes solutions tampons : pH5, pH7, pH9

Documents :

- Fiche technique 6 : Dosage enzymatique par la méthode deux points
- Annexe 4 : Clé dichotomique d'orientation
- Annexe 5 : Caractéristique structurale de l'organophosphorus phosphatase et réaction catalysée
- Fournis par le centre :
 - Fiche technique : coloration de Gram
 - Fiche technique : tests enzymatiques
 - Notice d'utilisation du spectrophotomètre

Information aux candidats :

Montrer à l'examineur :

- un champ microscopique judicieusement choisi, pour l'observation du Gram,
- la réalisation d'un dosage enzymatique.

Questionnements associés à l'activité professionnelle

L'**annexe 5** indique les caractéristiques structurales de l'OPH et la réaction catalysée.

Q8. Déterminer la nature biochimique de l'OPH et décrire sa structure.

Q9. Argumenter le caractère chromophore du p-nitrophénol d'après sa structure chimique.

La **fiche technique 6** présente le dosage enzymatique par la méthode deux points.

Q10. Relever les informations qui démontrent qu'il s'agit d'un dosage d'activité enzymatique par méthode deux points.

Q11. Relever les paramètres ayant une influence sur l'activité de l'enzyme. Argumenter.

Q12. Argumenter la composition des blancs réalisés pour mettre en œuvre la procédure de dosage enzymatique.

Ressources documentaires : fiches techniques et annexes

Sommaire

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique 5	Conception d'un couple d'amorces pour une PCR	Page 7
Fiche technique 6	Dosage enzymatique par la méthode deux points	Page 8

ANNEXES

ANNEXE 3	Article scientifique	Page 9
ANNEXE 4	Clé dichotomique d'orientation	Page 11
ANNEXE 5	Caractéristique structurale de l'organophosphorus hydrolase et réaction catalysée	Page 11

DOCUMENTS FOURNIS PAR LE CENTRE

- Fiche technique du centre : coloration de Gram
- Fiche technique du centre : tests enzymatiques
- Notice d'utilisation du spectrophotomètre

Fiche technique 5- Conception d'un couple d'amorces pour une PCR

A partir de la séquence du gène de l'aryldialkylphosphatase [*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a] récupérée au format Fasta **sur la base de données Gene sur NCBI**, déterminer le couple d'amorces le plus approprié répondant aux caractéristiques suivantes, en utilisant l'outil **Primer designing tool proposé par NCBI** :

- taille : 18 à 30 nucléotides
- contenu en GC : 40 à 60%
- séquence spécifique à la zone d'intérêt et site unique d'hybridation
- Tm compris entre 45 et 70°C
- faible formation de dimères et de structures secondaires
- extrémité 3' : présence de quelques bases GC en 3' (point de départ de la polymérisation), même chose pour l'extrémité 5' (fixation de l'amorce)
- Différence Tm < 4°C

Taille de l'amplicon attendu entre 500 et 750 pb

Informations utiles

aryldialkylphosphatase [*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a]

[Gene ID: 3366260](#)

Fiche technique 6- Dosage enzymatique par la méthode deux points

1. Matériels et réactifs

- Spectrophotomètre
- Bain thermostaté
- Enzyme : OPH
- Paranitrophényl Phosphate, (pNPP), analogue des pesticides organophosphorés
- Solution tampon à pH donné
- Solution d'arrêt : Na_2CO_3

2. Mode opératoire

Tube	Essai
V_{pNPP} à $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (mL)	0,6
$V_{\text{Solution tampon}}$ à pH donné (qsp 2,8 mL)
Pré-incuber à la température à 37 °C	
A t_0 , Ajouter V_{OPH} (mL)	0,2
Homogénéiser immédiatement en déclenchant le chronomètre	
Incuber à 37 °C	
A $t = 3 \text{ min}$, ajouter le réactif d'arrêt : $V_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$ (mL)	1
Homogénéiser rapidement	
Lire les absorbances à $\lambda = 405 \text{ nm}$ contre un blanc	

3. Données de sécurité

Réactifs	Pictogramme / Mention d'avertissement	Mention de danger
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	 Attention	H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

4. Exploitation des résultats

Grandeurs	Unités	Equation aux grandeurs
Vitesse initiale de la réaction	$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$	$v_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{10^6}{\varepsilon \times l} \times \frac{V_{ML}}{V_{MR}}$
Activité enzymatique	U	$Z_{(\text{OPH}; V_{\text{OPH}})} \text{ à pH} \dots = v_i \times V_{MR}$
Concentration d'activité catalytique	$\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	$b_{(\text{OPH}; \text{sol OPH})} \text{ à pH} \dots = \frac{Z_{(\text{OPH}; V_{\text{OPH}})} \text{ à pH} \dots}{V_{\text{OPH}}}$

Données :

$$\varepsilon_{\text{pNP}} = 4450 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Activité enzymatique en UI : quantité d'enzyme nécessaire pour former 1 μmol de produit par min

$$u_c = 0,60 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Factors Affecting Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Diazinon by Bacterial Mono-Culture of *Bacillus Sefensis* 7, Isolated From the Rhizosphere of Date Palm Tree

Magda M. Aly^{1,2*}, Buthinah A. Al-aidaroos¹ and Fahad A. Alfassi¹

¹Biology Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Saudi Arabia

²Botany Department, Faculty of Science, Kafr el-Sheikh University, Egypt

Abstract: Due to widespread use pesticides for crop protection, they are considered as contaminants in the, environmental matrices such soil which are exposed to large quantities. Three isolates from soil samples using enrichment culture technique have been isolated and grown in the minimal growth medium where Diazinon served as a sole carbon source (60 mg/l). Total three bacterial strains were screened for Diazinon degradation. The most active one was isolate BMNF7 (33% degradation). Lower degradation percentages were recorded for the two other isolates, BMRF3 and BMTF 8 (21-30%). The isolate BMNF7 was identified by morphological and biochemical studies as *Bacillus* sp. and identification was confirmed using 16srRNA. It was identified as *Bacillus sefensis* 7 and this isolate was able to degrade up to 63% of Diazinon (60 mg/l) in mineral salt medium (MSM) as a sole carbon source within 10 days of incubation. The bacterial growth and Diazinon degradation were accelerated when MSM supplemented with 0.75 (g/l) yeast extract and 0.5 g/l glucose as an additional carbon and nitrogen sources. The maximum degradation was obtained at pH 7 and 45°C after 10 days of incubation and using 4×10^6 CFU/ml as inoculum size. It was noticed that the best growth temperature was 37°C while the maximum degradation was at 45°C, meaning that high temperature increased degradation process. In conclusion the bacterial strains isolated from the agricultural soil, especially *Bacillus* species showed the ability to degrade Diazinon insecticide and optimization of growth conditions enhanced the percentage of degradation.

Keywords: *Bacillus*, Diazinon, Insecticide, Degradation, 16srRNA.

I. Introduction

Bien que le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. soit l'un des plus vieux arbres au monde, le charançon ferrugineux (*Rhynchophorus ferrugineus*) détruit les tissus du tronc, entraînant la chute de l'arbre. Les pesticides organophosphorés (OP), notamment le diazinon, sont utilisés dans le monde entier pour lutter contre cet insecte grâce à l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Le diazinon, largement utilisé en agriculture, est hautement toxique pour l'Homme et les animaux, et les résidus présents dans l'environnement présentent de nombreux risques pour la santé. Sa biodégradation par les bactéries est donc indispensable

L'Insecticide non systémique Diazinon est un liquide synthétique, incolore à brun foncé, dont la demi-vie moyenne est de 30 jours lorsqu'il est appliqué au sol. Sa structure chimique est le O, O-diéthyl 0-2-isopropyl-4-méthyl -6-pyrimidyl phosphorothioate. Le diazinon est un composé organophosphoré très efficace pour lutter contre les ectoparasites. La biodégradation des insecticides dans le sol varie selon leurs propriétés chimiques, le type de sol et l'activité des micro-organismes. L'application de pesticides au sol entraîne des modifications de la microflore, une diminution de la fertilité du sol, une diminution de la production agricole, une fixation de l'azote par les micro-organismes du sol, des symbioses chez les plantes, une nodulation chez les légumineuses et la croissance de bactéries cellulolytiques, solubilisatrices de phosphate et nitrifiantes. La dégradation complète d'un composé parent par des enzymes spécifiques fournit à la fois du carbone et de l'énergie nécessaires à la croissance et à la reproduction des microbes.

La diversité des communautés bactériennes associées au système racinaire du palmier dattier a été étudiée grâce à l'analyse de la diversité du gène codant pour l'ARNr 16S dans la rhizosphère et les fractions du sol entourant les racines. Il a été constaté que la région sud (la plus proche du désert) présente des conditions plus difficiles, favorisant la sélection d'un type de bactéries plus restreint. Ces îlots écologiques représentent un groupe spécifique de diversité biologique susceptible de contribuer à la fonctionnalité globale de la communauté bactérienne régionale et d'accroître la résilience du système aux changements environnementaux.

Par conséquent, l'objectif de cette étude était d'isoler et de caractériser des bactéries indigènes capables de métaboliser le diazinon comme unique source d'énergie et de carbone. Pour ce faire, des échantillons de sol ont été prélevés dans la rhizosphère du système racinaire du palmier dattier, contaminée par le diazinon. Les facteurs affectant la dégradation ont également été étudiés.

II. Material and methods

Collection of soil sample

Contaminated soil samples were collected from different date palm farms in western region, Saudi Arabia, in sterilized screw-capped test tubes for bacterial isolation. The samples were transferred to the laboratory and 1.0 g of each soil sample was suspended in a 250 ml conical flask containing 50 ml mineral salts (MS) medium enriched with Diazinon (0.1 % v/v) as a sole carbon source. The composition mineral salts medium was (g/l): 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.8 g K₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, and 5 mg FeSO₄·7H₂O. The medium pH was adjusted to pH 7 (Wu *et al.*, 2013). Flasks were placed in a shaking-incubator at 100rpm for 10 days. To ensure the ability of Diazinon degradation by bacteria, subsequent transfer of inoculum (3%) into a fresh MS medium containing increasing concentration of Diazinon was carried out. The used concentration of Diazinon was 0.1-6.0 % where very small colonies were obtained.

Isolation, purification and preservation of the strain

Aliquots (100 µl) from the Diazinon-enriched medium were streaked on both MS agar containing the tested concentration of Diazinon and Nutrient agar plates. All plates were incubated at 45°C for 7 days. Single colonies were picked up and subcultured into fresh MS agar amended with Diazinon until pure colonies were obtained. All pure colonies were preserved on Nutrient agar slants at 4°C or in 10 % sterile glycerol at 70°C.

Measuring Diazinon degradation on solid medium

Each selected bacterial culture was inoculated in the central of agar plat congaing MS agar medium with 5% v/v Diazinon which equal to 50 mg/l. All plates were incubated at 45°C for 10 days. All plates were examined and clear zone diameter (cm) was measured three times following by mean value calculation.

Morphology of colony and cells

The morphological characteristics of the colony; pigmentation, diameter, elevation and transparency was determined visually of 24 hrs old colony growing on Nutrient agar medium and incubated at 45°C. Cell shape, arrangement and reaction to the gram staining were assessed.

Biochemical characterization using the API50Ch strip kit

In order to investigate the biochemical characteristics of the strain API50Ch strip kit (Biomerieux, France) was used following the guidelines of the manufacturer. Results were recorded after 48hrs of incubation of API50Ch.

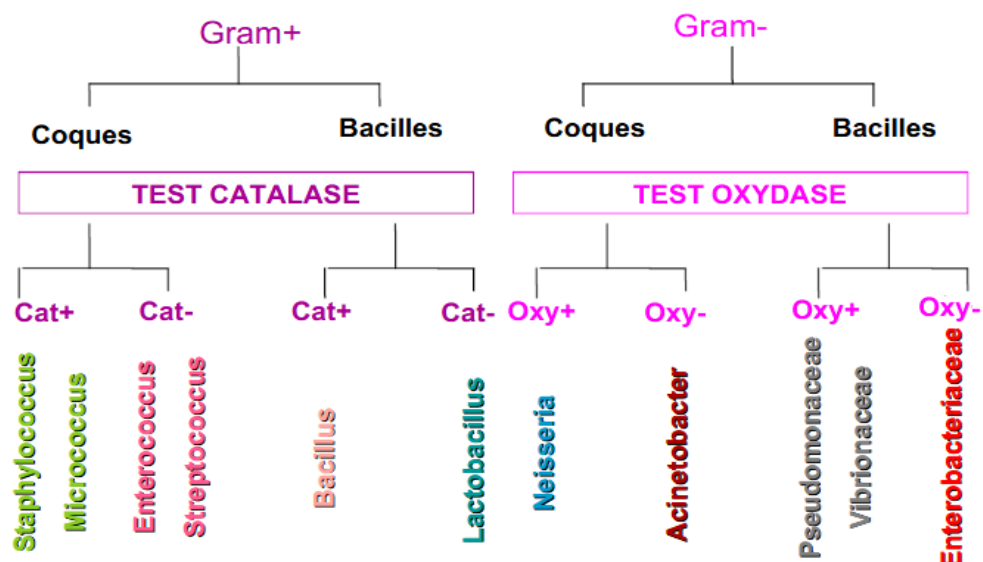
Identification of the isolates using 16S rRNA gene sequencing

16S rRNA gene was amplified using the universal primers 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' (Weisburg *et al.*, 1991), in 20 µl total PCR reaction. Genomic DNA was extracted from the strain using the InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA) following the instructions of the manufacturer. PCR conditions were adjusted as previously described (Khalifa *et al.*, 2015). For sequencing of the 16S rRNA gene, the Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) was used. Sequencing products were resolved on an Applied Biosystems model 3730XL automated DNA sequencing system (Applied Biosystems, USA) as described in Chun *et al.*, 2007, Tamura and Nei, 1993, Tamura *et al.*, 2011).

Measuring bacterial growth

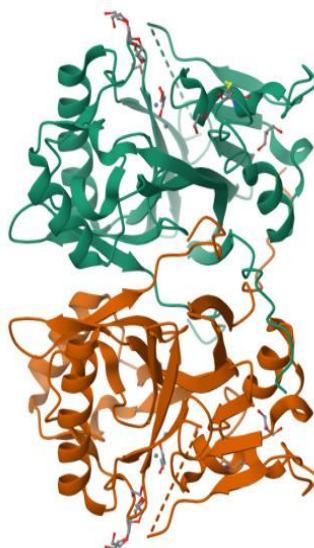
Bacterial growth in MS broth medium was determined by measuring the Absorbance at 550 nm. Moreover, after collecting the bacterial growth and centrifugation at 10,000 rpm, cell packed volume (CPV)/l were determined (George, 1990, Agwa *et al.*, 2000)

Annexe 4- Clé dichotomique d'orientation



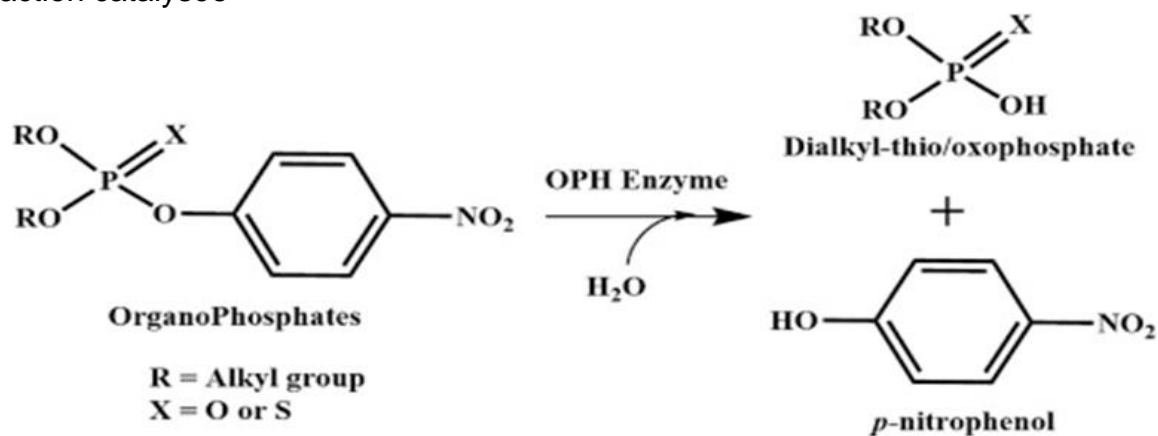
Annexe 5 : Caractéristique structurale de l'organophosphorus hydrolase et réaction catalysée

A. Structure 3D issue de l'OPH



Source : rcsb

B. Réaction catalysée



Source : Science directe