REMPLACEMENT 2019
Métropole

BACCALAURÉAT PROFESSIONNEL
E5 TECHNIQUES PROFESSIONNELLES

Option : Laboratoire contrôle qualité

Durée : 180 minutes

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Aucun**

Le sujet comporte 7 pages

SUJET

Les documents et le contexte ont été modifiés pour les besoins de l'épreuve

Cyanobactéries dans les eaux de baignade

Au plan d'eau douce de Sables-Les-Pins, l'employé municipal responsable de la surveillance de la qualité de l'eau de baignade est tenu d'effectuer un contrôle visuel quotidien pendant la saison balnéaire.
Début juin, il contacte l'ARS (Agence Régionale de Santé), après avoir observé un développement d'écume et un changement de couleur de l'eau.
En tant que technicien(ne) de l'ARS, vous effectuez un prélèvement pour réaliser la recherche :

- des indicateurs microbiologiques,
- des cyanobactéries et de leurs toxines.

1 - Contexte des activités de l'ARS *(2 points)*

1.1 Nommer le secteur professionnel concerné par le contrôle des eaux de baignade.

1.2 Préciser à l'aide du **document 1** les facteurs susceptibles d'entraîner la prolifération des cyanobactéries.

1.3 Citer les principales voies de contamination des personnes par les cyanobactéries ainsi que les symptômes associés dans le cadre des activités de baignade.

2 - Les indicateurs microbiologiques *(5 points)*

La qualité des eaux de baignade est évaluée au moyen d'indicateurs microbiologiques analysés dans le cadre du contrôle sanitaire organisé par l'ARS. Ceci permet de classer les eaux suivant leur qualité. Les indicateurs utilisés sont *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux.

2.1 Justifier le choix d'*Escherichia coli* et des entérocoques intestinaux comme indicateurs de la qualité des eaux de baignade.

Vous devez réaliser le dénombrement d'*Escherichia coli* et des entérocoques selon les normes ISO 9308 et ISO 7899, par méthode miniaturisée ou par filtration sur membrane. Les protocoles sont détaillés dans les **documents 2** et **3**.

2.2 Justifier le choix de la porosité à 0,45 µm de la membrane de filtration.

2.3 La méthode par filtration nécessite une étape de confirmation. Préciser l'objectif de cette étape.

2.4 Expliquer le principe de la mise en évidence des microorganismes dans la méthode miniaturisée en milieu liquide.

2.5 Justifier le choix de la méthode miniaturisée privilégiée par le laboratoire

3 - Identification et dénombrement des cyanobactéries *(3 points)*

Vous devez utiliser la méthode de référence d'Utermöhl qui permet la détermination et le comptage sous microscope.

Le document 4 présente le principe général de cette méthode.

3.1 Le protocole comporte une étape de décantation. Préciser le rôle de cette étape.

3.2 Préciser l'intérêt de réaliser une identification avant le comptage.

4 - Dosage des microcystines par HPLC *(10 points)*

Les toxines de cyanobactéries libérées dans le milieu aquatique sont d'une grande diversité. On en recense actuellement plus de 65 variantes. Les plus communes d'entre elles sont les microcystines, principalement LR, RR, et LA. La haute toxicité de certaines d'entre elles est à l'origine de l'évolution de la réglementation vers le paramètre « microcystines totales ». Il permet une évaluation large de la contamination par ces toxines et une estimation précise de la quantité totale de microcystines et de leurs dérivés présents.

Suite à la présence des cyanobactéries avec un nombre supérieur à 100 000 cellules/mL dans l'eau de baignade, la norme ISO 20179:2005 prévoit un dosage des microcystines afin de déterminer la qualité de l'eau.

La méthode préconisée est l'extraction en phase solide suivie d'une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec détection dans l'ultraviolet.

4.1 Justifier la présence d'une étape d'extraction dans le protocole précisé dans la norme.

Le **document 5** présente le schéma de principe de l'analyse par HPLC.

4.2 Identifier, à partir du **document 5**, les différentes étapes de l'analyse en chromatographie en phase liquide (HPLC).

Le détecteur fonctionne comme un spectrophotomètre. Cette analyse utilise les rayons ultraviolets pour quantifier les microcystines.

4.3 Justifier le choix de cette longueur d'onde en vous aidant du **document 6**.

Le **document 7** présente le chromatogramme obtenu avec l'échantillon prélevé dans le plan d'eau.

4.4 Indiquer en le justifiant si le système d'analyse chromatographique utilisé ici sur la microcystine RR, noté MC RR, est performant pour sa détection.

Face à la difficulté d'obtenir des chromatogrammes permettant une identification fiable des microcystines, il est nécessaire d'optimiser le choix des paramètres analytiques.

4.5 Indiquer des paramètres qui ont une influence sur cette technique de séparation (3 réponses minimum attendues).

4.6 Proposer des améliorations de la technique afin de rendre la détection des différentes microcystines plus performante.

Le laboratoire souhaite apporter un complément d'analyse sur la méthode chromatographique et vous demande d'essayer une analyse immunologique avec un test ELISA par compétition pour la recherche des toxines totales.

4.7 Donner le principe du test ELISA par compétition utilisé par le laboratoire et citer le matériel de lecture adapté.

4.8 Expliquer comment la technique ELISA permet de déterminer la quantité de microcystines totales.

4.9 Préciser les avantages de chacune de ces deux techniques (HPLC et ELISA) dans la recherche des microcystines.

DOCUMENT 1

Sables-Les-Pins, cyanobactéries au plan d'eau

Selon le dernier rapport d'analyse des eaux du plan d'eau, le taux de cyanobactéries est élevé. De quoi s'agit-il ? Et quels sont les risques ?

Les cyanobactéries

On les appelle également les « algues bleues » en raison de la couleur qu'elles donnent à l'eau. Il s'agit d'une famille de « micro-algues » d'eau douce de type bactérien, dont certaines représentent un risque sanitaire pour la santé humaine et animale car elles sont capables de produire des toxines. On en trouve en permanence dans les eaux douces, mais c'est lorsqu'elles prolifèrent qu'elles peuvent devenir dangereuses. En général, leur prolifération commence au printemps, lorsque la température de l'eau dépasse 15 °C et le risque court jusqu'à l'automne. La chaleur, l'ensoleillement, une eau riche en phosphore et en azote sont des éléments propices au développement de l'algue.

Les risques

Les toxines (en particuliers les microcystines) dégagées par la prolifération des « algues bleues » peuvent se concentrer dans le zooplancton, c'est-à-dire au début de la chaîne alimentaire. Elles sont donc susceptibles d'être présentes dans le poisson, d'où la consigne de ne pas consommer ses prises en période de pollution. Concernant la baignade et les activités nautiques, le risque d'infection se situe au niveau du contact avec la peau et des muqueuses. Les cyanobactéries peuvent provoquer des conjonctivites, des irritations de la gorge et des oreilles, des maux de tête, des diarrhées, de la fatigue ou encore des vertiges.

Les recommandations

Les autorités recommandent aux usagers du plan d'eau d'éviter les zones de dépôts d'algues et d'écumes, de prendre une douche après des activités nautiques, de bien nettoyer le matériel utilisé et surtout de ne pas consommer les poissons pêchés. Le public est invité à consulter un médecin si des troubles apparaissent.

Source : modifié d'après « L'hebdo de Sèvre et Maine » 09/06/2016

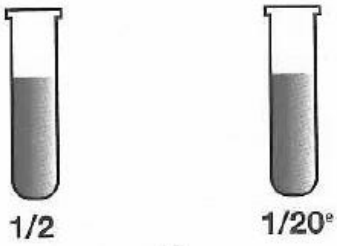
DOCUMENT 2

Méthode miniaturisée en milieu liquide en microplaque

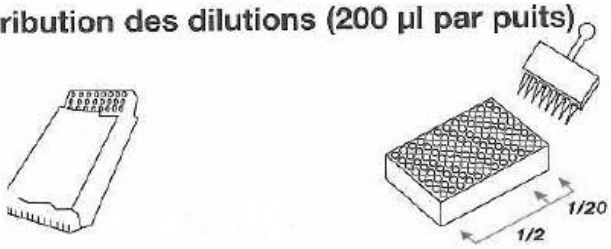
Choix des dilutions

Origine de l'échantillon	Nombre de dilutions	Nombre de puits ensemencés par dilution	Intervalle de détection des bactéries/100 ml
Eaux de baignade	2	64 puits au 1/2 32 puits au 1/20e	15 à 3,5.10⁴

- **Préparation du diluant**
- **Dilutions de l'échantillon**



Distribution des dilutions (200 µl par puits)



Incubation des microplaques

36 h à 44°C

Lecture des microplaques avec lumière UV (λ = 366 nm)

Interprétation / Détermination du Nombre le Plus Probable :

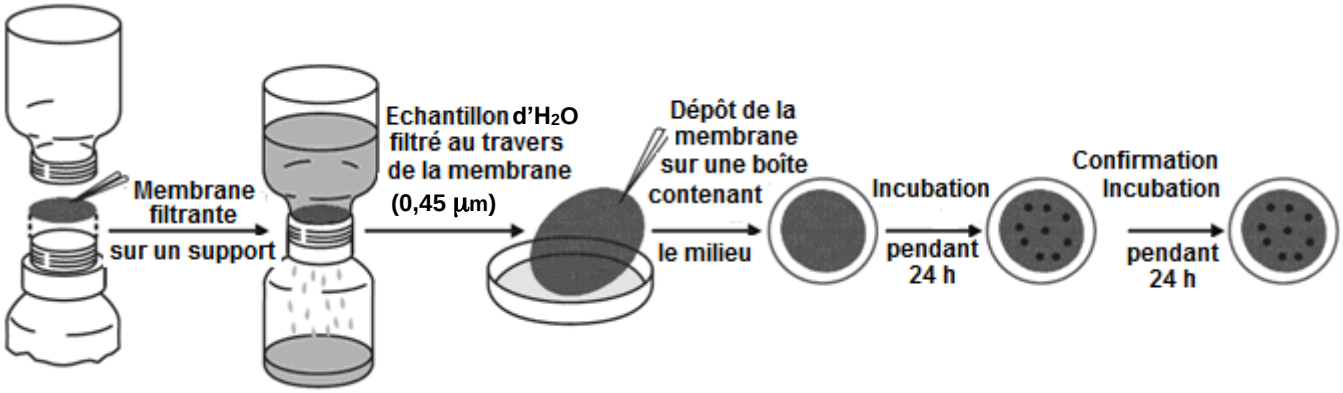
- *Pour chaque dilution, noter le nombre de puits positifs (fluorescence bleue).*
- *Rechercher le Nombre le Plus Probable dans le tableau statistique correspondant à la dilution utilisée.*

	Microplaque *E.coli* MU/EC	Microplaque *Enterococcus* MU/SF
Enzyme	β-D glucuronidase	β-D glucosidase
Substrat	MUG	MUD
Fluorescence	bleue	bleue

Source : modifié d'après « Catalogue Bio-Rad, Industrie et environnement »

DOCUMENT 3

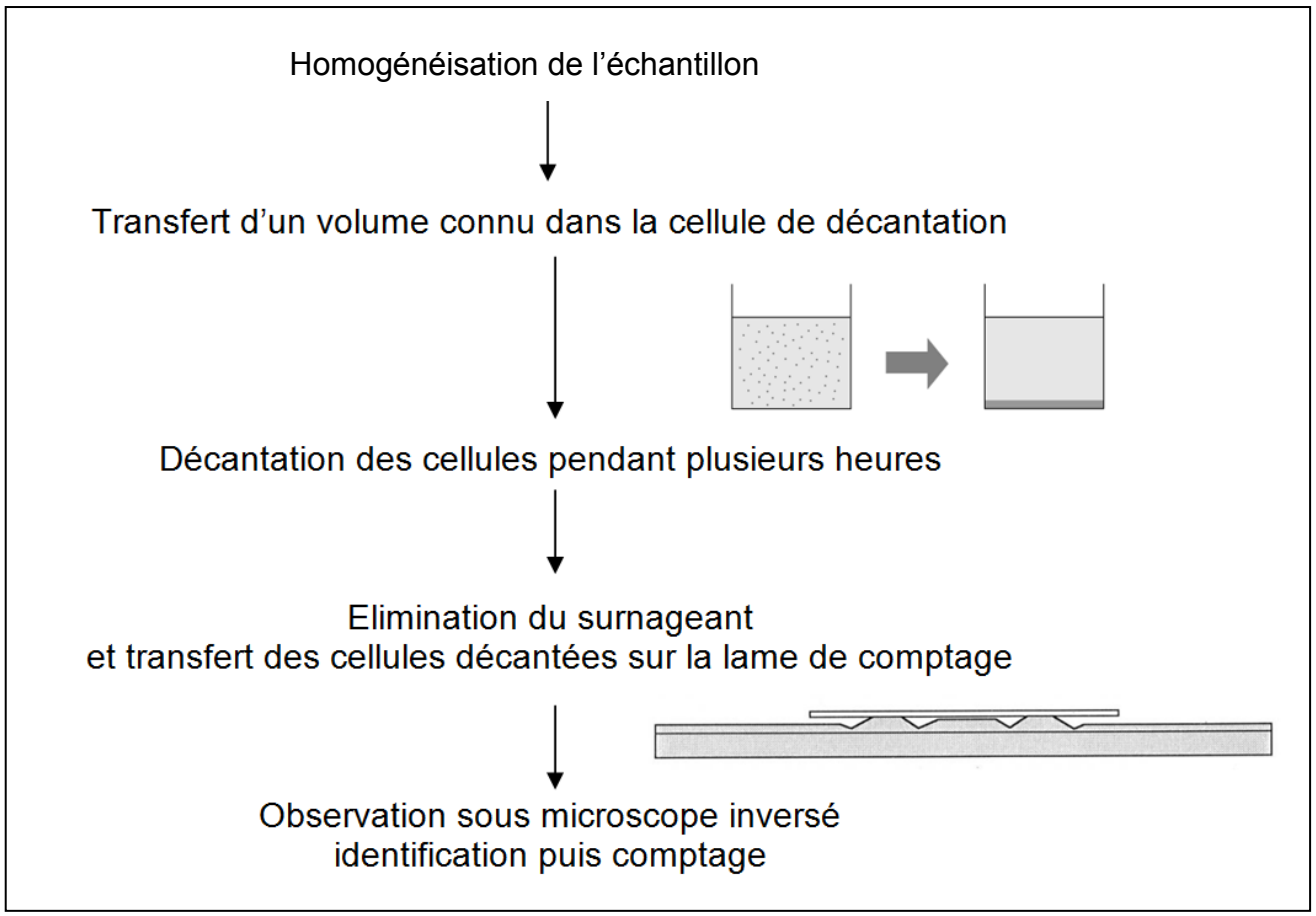
Dénombrement par filtration sur membrane



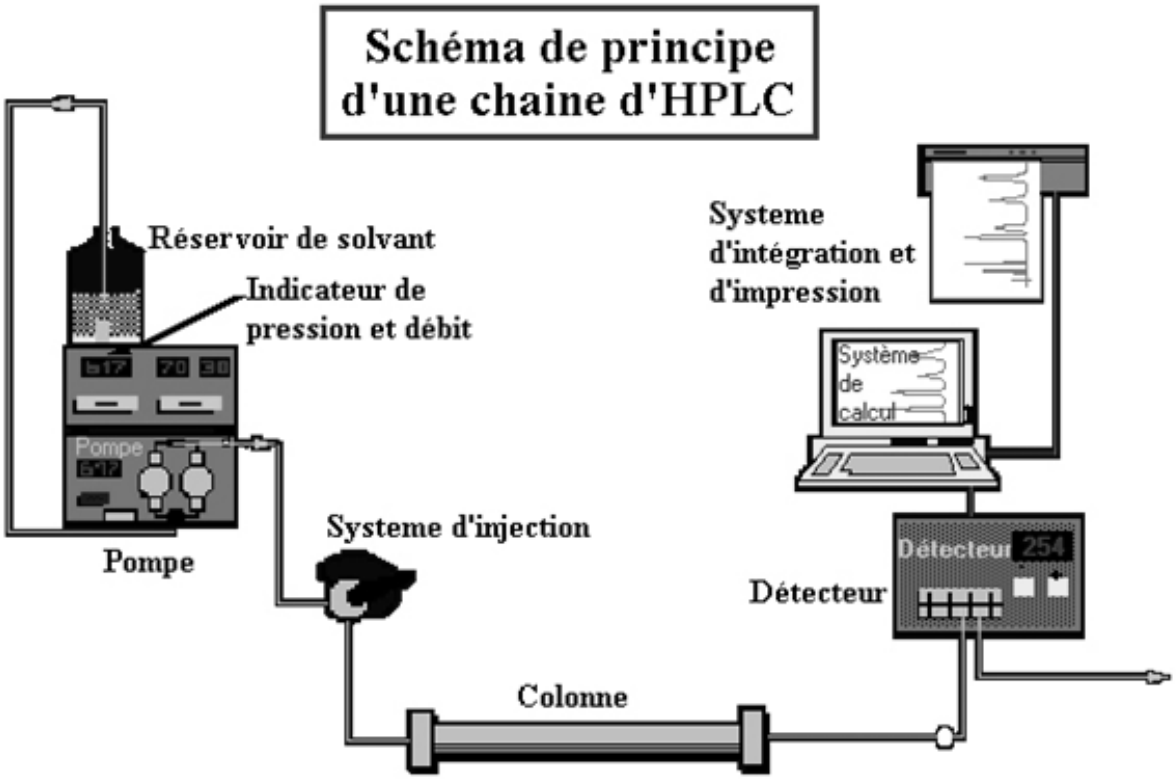
Source : modifié d'après « biotechnologies Terminale STL, Canopée »

DOCUMENT 4

Méthode d'Utermöhl



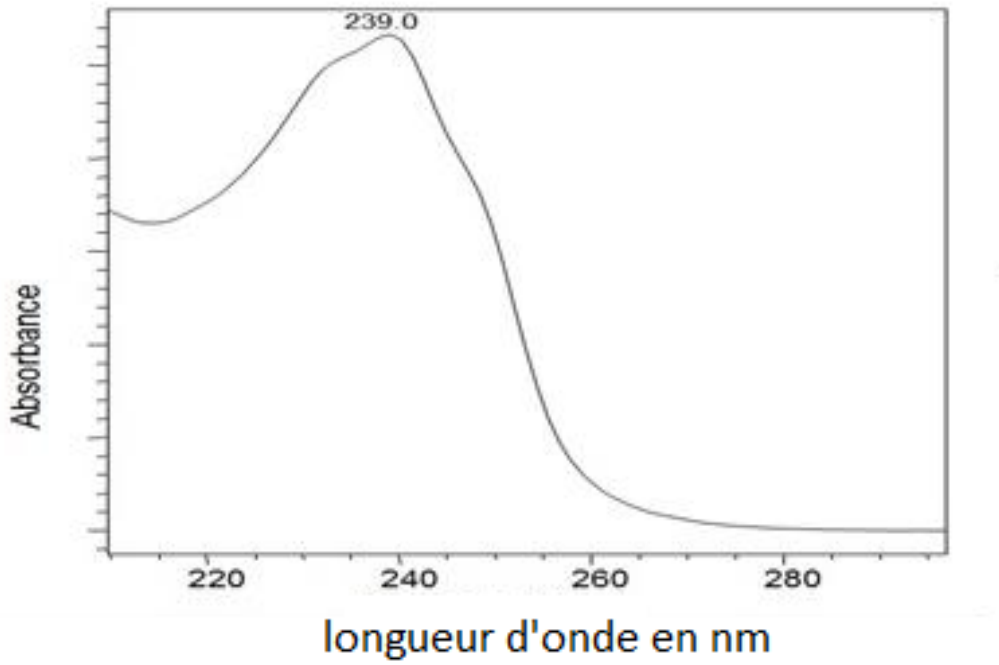
DOCUMENT 5



Source : http://biotech.spip.ac-rouen.fr/

DOCUMENT 6

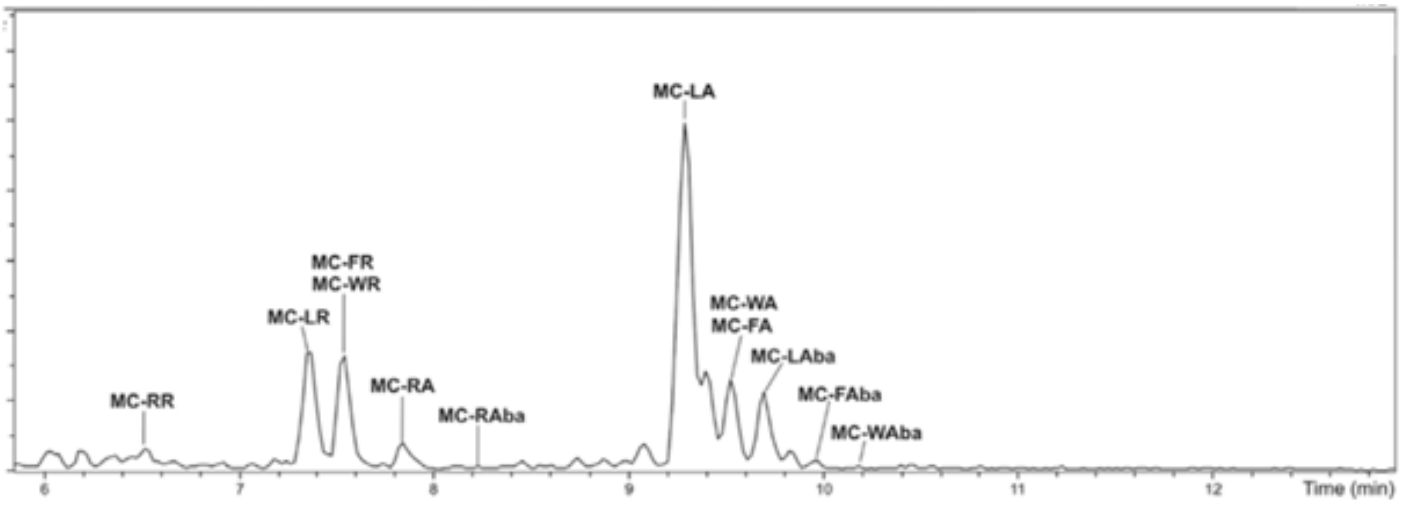
Spectre d'absorption des microcystines



Source : http://www.enzolifesciences.com/

DOCUMENT 7

Résultat chromatographique du dosage des microcystines



Source : Oxford University Press