

Bactéricidie de solutions d'éthanol sur des souches données

L'éthanol en solution aqueuse à 70% (v/v) est un désinfectant et/ou un antiseptique courant.

Dans de nombreuses installations chromatographiques, des solutions d'éthanol vers 20% (v/v) sont utilisées pour les rinçages. On cherche à mesurer l'activité bactéricide éventuelle de ce type de solutions sur des souches pures données. On souhaite tester des solutions à 20 ou 23% d'éthanol.

On dispose d'une culture de la souche pure choisie (*E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*) en bouillon nutritif aéré agité de 18 heures à 37°C.

Préliminaire : définissez les termes antiseptique et désinfectant.

1 Préparation des dilutions de la souche pure test

Utiliser la culture en bouillon de 18 heures fournie. Vérifier que l'absorbance à 600 nm due à la biomasse se situe entre 0,5 et 1,5 (soit 1 à 3 10^9 bactéries par mL). (La limite de linéarité est à 0,7 avec le matériel employé et 0,1 d'absorbance correspond à $2 \cdot 10^8$ cellules par mL.)

Réaliser une gamme de dilutions de raison 1/10 jusqu'à 10^{-8} (sous un volume final de 1 mL, solvant = NaCl 9 g/L stérile proposé en flacon stérile). Cette gamme est à utiliser pour réaliser les opérations proposées au paragraphe 2 et au paragraphe 3.

2 Dénombrement de la souche test par comptage d'unités formant colonie (UFC) après inoculation de spots

Déposer 10 μL de chaque dilution 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} de la culture de 18h de la souche test, en spot, sur un milieu de culture en boîte de Pétri (surface « sèche »). Doubler la manipulation (les 6 dépôts sur une boîte unique). Laisser sécher les dépôts avant incubation, 18 h à 37°C.

Un spot donne un résultat lisible s'il apparaît entre 10 et 20 colonies.

3 Etalonnage de la méthode semi-quantitative d'évaluation de taux de survie

Pour chaque dilution de la souche test, à partir de la dilution 10^{-4} et jusqu'à 10^{-8} :

- effectuer un prélèvement de 10 μL et ensemercer une boîte de milieu de culture sous forme d'une strie de 5 cm en effectuant un aller et retour à l'öse tel que l'aller-retour dépose les 10 μL (par exemple à l'anse calibrée de 10 μL ou dépôt à la pipette mécanique de 10 μL et aller retour d'étalement immédiat à l'anse) ;
- laisser sécher la boîte puis incuber.

On réalise évidemment les 5 stries sur une unique boîte. Incuber à 37°C. Le point important dans cette manipulation est la reproductibilité des gestes techniques. La surface des géloses doit être « sèche ».

4 Cinétiques de bactéricidie

Tube cinétique bactéricidie éthanol 23 % (22,77%)	Tube bactéricidie éthanol 20 % (19,8%) en 1 heure	Tube bactéricidie éthanol 70 % en 30 s
<ul style="list-style-type: none"> 9,9 mL de la solution d'éthanol à 23 % (v/v) en tube à essai stérile. Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test à $t = 0$ (t désigne le temps). Homogénéiser. Après Δt minutes d'incubation, prélever 0,1 mL. Transférer immédiatement dans un tube de 9,9 mL de solution stérile de NaCl à 9 g/L. Homogénéiser. Ensemencer à la strie, 10 μL, comme indiqué au paragraphe 3. Incuber. Tester $\Delta t = 0 \text{ min}, 10 \text{ min}, 20 \text{ min}, 45 \text{ min}$. 	<ul style="list-style-type: none"> 9,9 mL de la solution d'éthanol à 20 % (v/v) en tube à essai stérile. Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test. Homogénéiser. Après 1 heure d'incubation, prélever 0,1 mL. Transférer immédiatement dans un tube de 9,9 mL de solution stérile de NaCl à 9 g/L. Homogénéiser. Ensemencer une strie de 10 μL de la suspension obtenue, comme indiqué au paragraphe 3. Incuber. 	<ul style="list-style-type: none"> 9,9 mL de la solution d'éthanol à 70 % (v/v) en tube à essai stérile. Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test. Homogénéiser. Après 30 secondes d'incubation, prélever 0,1 mL. Transférer immédiatement dans un tube de 9,9 mL de solution stérile de NaCl à 9 g/L. Homogénéiser. Ensemencer une strie de 10 μL de la suspension obtenue, comme indiqué au paragraphe 3. Incuber.

5 Validation de l'arrêt de l'effet de l'éthanol par dilution au 1/100 en solution stérile de NaCl à 9 g/L

- 9,9 mL de solution d'éthanol vers 0,7 à 1 % (v/v) en tube à essai stérile.
- Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test. Homogénéiser.
- Après **2 heures d'incubation**, diluer en série géométrique de raison 1/10 jusqu'à 10^{-5} (solvant = NaCl 9 g/L stérile).
- Déposer 10 μL de chaque dilution $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ en spot, sur un milieu de culture en boîte de Pétri (surface « sèche »). Doubler la manipulation (les 6 dépôts sur une boîte unique). Laisser sécher les dépôts avant incubation, 18 h à 37°C.
- Un spot donne un résultat lisible s'il apparaît entre 10 et 20 colonies.

6 Questions. Compte rendu.

- Présenter les manipulations et les résultats expérimentaux du paragraphe 2 en remplissant le tableau de l'annexe 1.
- Présenter les manipulations et les résultats expérimentaux du paragraphe 3 en remplissant le tableau de l'annexe 2.
- Présenter les résultats de la manipulation du paragraphe 5 en remplissant le tableau de l'annexe 3. Peut-on en conclure que l'éthanol vers 0,7-1 % n'exerce aucun effet de bactéricidie en 2 heures ? En quoi cet essai valide-t-il les manipulations proposées au paragraphe 4 ?
- Présenter les résultats des manipulations proposées au paragraphe 4. Analyser, conclure. Estimer notamment le temps de réduction décimale pour la souche testée dans l'éthanol à x % ($x = 20$ ou 25).

Annexe 1 Dénombrement de la souche test (UFC, spots)

Trouble-absorbance de la souche lue contre le milieu à 620 nm :

[bactéries] estimée = /mL (valeur dite n1)

dilution	inoculum	UFC attendues	UFC obtenues	[UFC] (calcul de moyenne pondérée)
10 ⁻⁵	10 µL			[UFC] = valeur dite n2
10 ⁻⁵				
10 ⁻⁶				
10 ⁻⁶				
10 ⁻⁷				
10 ⁻⁷				

Annexe 2 Etalonnage de la méthode semi-quantitative d'évaluation du taux de survie

dilution	Inoc.	UFC attendues d'après n1	UFC attendues d'après n2	D'où l'allure de strie attendue	Allure de strie obtenue après culture	Taux de survie équivalent
10 ⁻⁴	10 µL					1 (100%)
10 ⁻⁵						
10 ⁻⁶						
10 ⁻⁷						0,001 (0,1%)
10 ⁻⁸						

Annexe 3 Validation d'absence de bactéricidie de l'éthanol à conc. inférieure à 0,7% (v/v)

2 heures de contact avec éthanol 0,7%, (dilution au 1/100de la culture de départ)

Dilution déposée	Inoc.	Dilution équivalente de la culture de départ	UFC attendues d'après UFC obtenues en §2 (annexe 1, colonnes 4 et 5)	UFC obtenues après culture	conclusion
10 ⁻³	10 µL				
10 ⁻³					
10 ⁻⁴		10 ⁻⁶			
10 ⁻⁴					
10 ⁻⁵					
10 ⁻⁵					

Bibliographie : B Joly, Antiseptiques et désinfectants, L'information du Biotechnicien, (1993)1:3:113-136 ; Antiseptiques et désinfectants chimiques, activité bactéricide de base, norme NF EN 1040 1997 ; Sujet de TP de techniques biologiques, concours A TB « agro-veto », 1995