

## **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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  et ensemencer 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  $\mu\text{L}$  (par exemple à l'anse calibrée de 10  $\mu\text{L}$  ou dépôt à la pipette mécanique de 10  $\mu\text{L}$  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"> <li>• 9,9 mL de la solution d'éthanol à 25 % (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.</li> <li>• Après <math>\Delta t</math> 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 <math>\mu\text{L}</math>, comme indiqué au paragraphe 3. Incuber.</li> <li>• Tester <math>\Delta t = 0 \text{ min}, 10 \text{ min}, 20 \text{ min}, 45 \text{ min}</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 9,9 mL de la solution d'éthanol à 20 % (v/v) en tube à essai stérile.</li> <li>• Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test. Homogénéiser.</li> <li>• 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 <math>\mu\text{L}</math> de la suspension obtenue, comme indiqué au paragraphe 3.</li> <li>• Incuber.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 9,9 mL de la solution d'éthanol à 70 % (v/v) en tube à essai stérile.</li> <li>• Ajouter 0,1 mL de bouillon de culture de 18 heures de la souche test. Homogénéiser.</li> <li>• 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 <math>\mu\text{L}</math> de la suspension obtenue, comme indiqué au paragraphe 3.</li> <li>• Incuber.</li> </ul>

#### 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  $\mu\text{L}$  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 <sup>-5</sup>	10 µL			[UFC] =      valeur dite n2
10 <sup>-5</sup>				
10 <sup>-6</sup>				
10 <sup>-6</sup>				
10 <sup>-7</sup>				
10 <sup>-7</sup>				

**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 <sup>-4</sup>	10 µL					1 (100%)
10 <sup>-5</sup>						
10 <sup>-6</sup>						
10 <sup>-7</sup>						0,001 (0,1%)
10 <sup>-8</sup>						

**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 <sup>-3</sup>	10 µL				
10 <sup>-3</sup>					
10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-6</sup>			
10 <sup>-4</sup>					
10 <sup>-5</sup>					
10 <sup>-5</sup>					

*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*