



University of the  
West of England

**PRISE DE VUES ACCÉLÉRÉE AFIN DE DÉMONTRER  
LES CAPACITÉS ANTIMICROBIENNES  
POTENTIELLES  
DES REVÊTEMENTS DE SOL DYCEM  
DANS LA MAÎTRISE DE LA CONTAMINATION.**

**MAI 2009**

**GARETH ROBINSON**

# **PRISE DE VUES ACCÉLÉRÉE AFIN DE DÉMONTRER LES CAPACITÉS ANTIMICROBIENNES POTENTIELLES DES REVÊTEMENTS DE SOL DYCEM DANS LA MAÎTRISE DE LA CONTAMINATION.**

## **RÉSUMÉ**

Un volume défini de bactéries rapporteuses bioluminescentes a été déposé sur des coupons de 20 mm x 20 mm de revêtement de sol Dycem, de carreaux en vinyle et d'un tapis pelable. L'inhibition métabolique a été observée par le biais du contrôle de la bioluminescence bactérienne sur les trois surfaces, mais l'effet s'est manifesté plus rapidement sur les revêtements Dycem que sur les carreaux en vinyle ou sur le tapis pelable. Le dénombrement de récupération au bout de trois heures d'exposition aux surfaces du sol a indiqué une réduction variant de 65% à 100% du nombre des organismes viables récupérés sur les revêtements de sol Dycem par rapport aux revêtements de contrôle. Sur les carreaux en vinyle et le tapis pelable, il y avait une légère augmentation du nombre des survivants viables récupérés par rapport aux revêtements de contrôle. Le revêtement de sol Dycem inhibe les activités métaboliques et réduit le nombre de survivants viables récupérés de *Salmonella enterica* Sérovar Typhimurium DT104 pGLITE. Il n'est pas possible d'affirmer si cet effet est dû aux antimicrobiens imprégnés ou au séchage rapide de l'inoculum sur cette surface.

## **MÉTHODOLOGIE**

**Conditions de croissance bactérienne et médias.** *Escherichia coli* O157:H7<sup>tox</sup>-pLITE et *Salmonella enterica* Sérovar Typhimurim DT104 pGLITE ont été cultivés sur une gélose nutritive à 37 °C supplémentés respectivement par 10 mg/L d'ampicilline ou 10 mg/L de gentamicine. Une sélection antibiotique a été utilisée pour maintenir les gènes *lux* sur plasmide et le phénotype bioluminescent. Des cultures pendant la nuit ont été préparées dans 10 mL de bouillon nutritif supplémenté par 10 mg/L d'ampicilline/de gentamicine tel qu'approprié, et incubées à 37 °C dans un agitateur orbital à 200 tr/min.

**Préparation des matériaux de surface.** Le revêtement de sol antimicrobien Dycem, le tapis pelable et les carreaux en vinyle ont été découpés en coupons de 20 mm x 20 mm. La surface adhésive du tapis pelable a été révélée juste avant l'ensemencement. Les surfaces d'essai étaient propres et sèches au moment de l'ensemencement. Dans

le cas où le dénombrement de récupération a été effectué, les coupons ont été stérilisés avec 100% d'éthanol, puis ont été soumis à un séchage à l'air et à une radiation UV.

**Préparation de l'inoculum.** 100  $\mu$ L d'une culture pendant la nuit a été sous-cultivée dans 55 mL de bouillon nutritif frais et préchauffé supplémenté par un antibiotique sélectif dans un flacon Erlenmeyer stérile. Le flacon a été mis en incubation à 37 °C dans un agitateur orbital à 200 tr/min jusqu'à obtention d'une densité optique comprise entre 0,4 et 0,6 à 600 nm ( $OD_{600}$ ). 50 mL de la culture ont été centrifugés à 4100 tr/min pendant 20 minutes à 20 °C. Aux fins d'imagerie, la pastille résultante a été resuspendue dans 50 mL de bouillon nutritif frais ou de solution stérile de Ringer ou dans un volume dix fois plus faible de bouillon nutritif.

**Ensemencement.** Les matériaux d'essai ont été soigneusement ensemencés par un volume défini de suspension bactérienne (voir ci-dessous). L'inoculum a été placé sur la surface des matériaux sous forme d'une goutte unique. En ce qui concerne les expériences d'imagerie, les coupons d'essai étaient agencés selon une configuration carrée, laissée ouverte à l'air. Pour les expériences liées au dénombrement de récupération, des coupons stérilisés ont été placés dans des boîtes de Pétri. À la suite de l'ensemencement, les couvercles ont été remis en place et les boîtes ont été laissées sans les perturber dans un poste de sécurité microbiologique de classe II, le ventilateur étant coupé ou allumé pour assurer de l'air immobile ou agité autour de la boîte.

**Recueil des données.** En ce qui concerne les expériences d'imagerie, une seule intégration de 60 secondes a été saisie toutes les 4 minutes afin de produire une série d'images fixes sur une durée d'environ 6,5 heures à l'aide du système d'imagerie iXon<sup>EM+</sup> DU-897BV (Andor, Belfast, Royaume-Uni). Les images fixes ont été utilisées pour produire les vidéos ci-jointes en annexe au rapport. Les données brutes

ont aussi été analysées afin de montrer la réduction de l'intensité lumineuse dans le temps. En ce qui concerne les expériences en vue du dénombrement de récupération, les couponsensemencés ont été transférés dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 20 mL d'eau peptonée tamponnée supplémentés par 10 mg/L d'antibiotique sélectif (diluant de récupération) et transférés dans un agitateur orbital agité à 200 tr/min pendant 20 minutes. Le diluant de récupération a été dilué selon 1:10 dans une solution de Ringer stérile, et des boîtes de récupération en trois exemplaires ont été produites à l'aide d'un ensemenceur spiral automatique Whitley (Don Whitley Scientific, Shipley, R-U). Les boîtes ont été mises en incubation pendant la nuit à 37 °C, puis on a procédé au dénombrement de récupération.

**Enquête expérimentale.** Les échantillons de matériaux ont étéensemencés par un volume défini de bactéries dont la liste figure ci-dessous :

- Expériences d'imagerie 1. *E. coli* pLITE suspendu dans du bouillon nutritif et une solution de Ringer. 20 µL du volume déposé.
- Expérience d'imagerie 2. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans un bouillon nutritif et une solution de Ringer. 50 µL du volume déposé.
- Expérience d'imagerie 3. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans un bouillon nutritif. 50 µL du volume déposé.
- Expérience d'imagerie 4. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans un bouillon nutritif. Inoculum concentré de l'ordre de dix fois. 50 µL du volume déposé.
- Expérience d'imagerie 5. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans un bouillon nutritif. Inoculum concentré de l'ordre de dix fois. 50 µL du volume déposé.

- Expérience de dénombrement de récupération 1. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans une solution de Ringer. 50 µL du volume déposé.  
Durée de contact : 3 heures. Air immobile.
- Expérience de dénombrement de récupération 1. *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu dans une solution de Ringer. 50 µL du volume déposé.  
Durée de contact : 3 heures. Air agité.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'expérience d'imagerie initiale avec *E. coli* O157 pLITE a donné des images présentant un mauvais rapport signal/bruit, qui ne convenaient pas à la conversion sous format vidéo. La décision a été prise d'utiliser *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE car il s'est avéré précédemment être une souche rapporteuse systématiquement lumineuse.

L'expérience d'imagerie initiale a utilisé cet organisme suspendu dans un bouillon nutritif et une solution de Ringer afin d'établir le milieu le plus approprié aux travaux d'imagerie ultérieurs. Le fichier vidéo et les images fixes associées sont réunis dans le répertoire VIDEO 1 du disque ci-joint en annexe. Les échantillons de revêtement de solensemencés avec une solution de Ringer et un bouillon nutritif sont présentés respectivement à gauche et à droite. Les données brutes provenant de ces images sont présentées aux figures 1 et 2 correspondant respectivement au bouillon nutritif et à la solution de Ringer. Dans la solution de Ringer et en fait, tout au long des travaux expérimentaux, il existe des différences dans l'intensité lumineuse initiale émanant de chaque surface de revêtement de sol. Ceci est dû aux différentes colorations des surfaces. Les revêtements de sol Dycem étant de la couleur la plus foncée, absorbent

la lumière incidente tandis que les carreaux en vinyle sont de couleur très claire, et reflètent la lumière incidente vers l'optique. Le principal facteur dans l'évaluation des données n'est pas le niveau de lumière de départ, mais le taux du déclin. Les trois surfaces soumises aux essais ont montré un déclin initial similaire de l'intensité lumineuse (Figure 1), mais sur les revêtements de sol Dycem, les niveaux lumineux étaient réduits à l'éclairage de fond en environ 90 minutes. Le tapis pelable a montré une chute lumineuse initiale très similaire, mais le taux du déclin s'est ralenti et il a fallu environ 4,5 heures pour obtenir une chute jusqu'à l'éclairage de fond. Sur les carreaux en vinyle, le déclin lumineux a été rapide initialement, puis s'est ralenti au bout d'une heure, et a atteint les niveaux d'éclairage de fond au bout d'environ 4 heures.

La réduction aux niveaux de fond a demandé environ le même délai que lorsque l'inoculum était suspendu dans un bouillon nutritif (Figure 2), toutefois, les niveaux lumineux sont restés supérieurs pendant plus longtemps. Les niveaux lumineux sur le revêtement de sol Dycem ont été réduits aux niveaux du fond à un taux considérablement plus rapide que sur le tapis pelable, ou les carreaux en vinyle, ce qui suggère que l'inhibition métabolique se produit beaucoup plus rapidement sur les revêtements de sol Dycem. Avant le commencement des travaux actuels, on avait observé que la nature physique des revêtements de sol Dycem encourageait l'étalement des liquides plutôt que de rester en gouttelettes. Une fois toutes les imageries terminées, tous les échantillons ont été séchés. La VIDEO 1 montre que les gouttelettes placées sur le revêtement de sol Dycem s'étaient avant l'arrêt de l'émission lumineuse tandis que sur les deux autres surfaces, les gouttelettes sont restées intactes. Il n'est pas possible d'affirmer si l'inhibition métabolique rapide sur

le revêtement de sol Dycem est due à l'imprégnation antimicrobienne ou au séchage accéléré sur cette surface, ou à une combinaison des deux.

Trois expériences d'imagerie ultérieures ont été effectuées avec *S. enterica* sv. Typhimurium pGLITE suspendu uniquement dans un bouillon nutritif, car cela présentait des niveaux lumineux supérieurs à ceux de la suspension dans une solution de Ringer. La figure 3 montre que la configuration du déclin au niveau de l'intensité lumineuse est la même que celle décrite ci-dessous. L'inhibition des activités métaboliques se produit essentiellement plus vite sur les revêtements de sol Dycem que sur les autres revêtements ; et sur les carreaux en vinyle, elle se produit légèrement plus vite que sur le tapis pelable. La VIDEO 2 montre la même prolifération rapide de l'inoculum, qui est suivie du déclin au niveau de l'intensité lumineuse comme celle du revêtement de sol Dycem observée précédemment.

Les figures 4 et 5 représentent les données extraites de la VIDEO 3 et de la VIDEO 4. Elles reproduisent l'expérience d'imagerie précédente, mais l'inoculum bactérien a été concentré dix fois avant l'ensemencement afin d'améliorer encore le rapport signal/bruit. L'inoculum plus concentré n'affecte pas la durée requise pour que la bioluminescence soit réduite aux niveaux de fond, ce qui suggère que le séchage est un facteur de l'inhibition métabolique observée car le volume déposé est resté inchangé. Les deux fichiers vidéos montrent clairement que l'inhibition métabolique se produit plus rapidement sur le revêtement de sol Dycem que sur les autres revêtements de sol.

Les figures 6 et 7 montrent les résultats des dénombrements de récupération lorsque *S. enterica* a étéensemencé sur les surfaces de revêtements de sol, et laissé sans le

perturber pendant trois heures. Dans les deux cas, une plus grande quantité de bactéries a été récupérée sur les carreaux en vinyle et le tapis pelable que sur les échantillons de contrôle. Étant donné que les échantillons ensemencés étaient couverts, il existait un élément de protection provenant de la dessiccation absent pendant l'expérience d'imagerie. Cela peut avoir permis une croissance limitée des bactéries sur les revêtements de sol, ou une croissance dans le diluant de récupération à la fin de la période de contact. Par contre sur le revêtement de sol Dycem, le nombre de bactéries était réduit de plus de 65% (Figure 6) lorsqu'ils étaient laissés dans l'air immobile. Sur ces échantillons de revêtement de sol, l'inoculum n'avait pas séché mais il était étalé avant la fin de la période expérimentale tandis que l'inoculum sur les carreaux en vinyle, et sur le tapis pelable était resté sous forme de gouttelette intacte. Dans les cas où le poste de sécurité microbiologique de classe II était opérationnel (Figure 7), bien que les boîtes soient couvertes, l'inoculum était complètement sec sur le revêtement de sol Dycem. Dans ce cas, il n'y avait pas de survivants viables récupérés sur le revêtement de sol Dycem. Sur le tapis pelable et sur les carreaux en vinyle, le nombre de survivants était une fois de plus légèrement supérieur au nombre sur les revêtements de contrôle.

## **RÉSUMÉ**

Les travaux expérimentaux entrepris montrent que l'inhibition métabolique de *S. enterica* se produit plus rapidement sur le revêtement de sol Dycem que sur les carreaux en vinyle ou sur le tapis pelable. Le dénombrement de récupération a montré que le nombre de bactéries viables, récupérable sur le revêtement de sol Dycem était inférieur à celui récupérable sur les carreaux en vinyle ou le tapis pelable. Étant donné la nature limitée des travaux expérimentaux, il n'est pas possible d'affirmer que

l'effet inhibitoire des revêtements de sol Dycem est dû à l'imprégnation antimicrobienne ou à l'étalement plus rapide et au séchage accéléré des liquides sur cette surface.

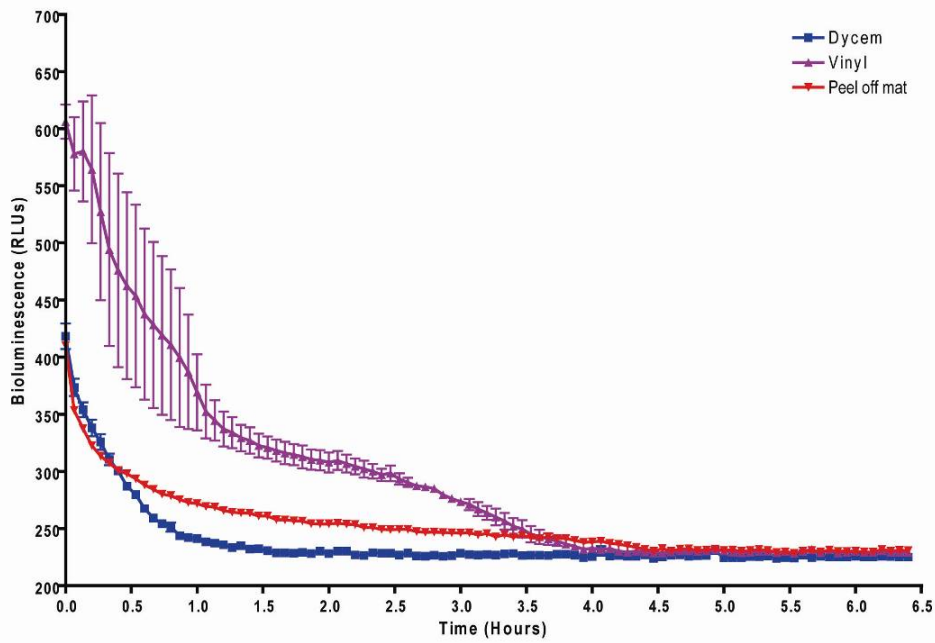


Figure 1. Light output from *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE suspended in Ringer's solution inoculated onto a range of flooring surfaces. n = 3

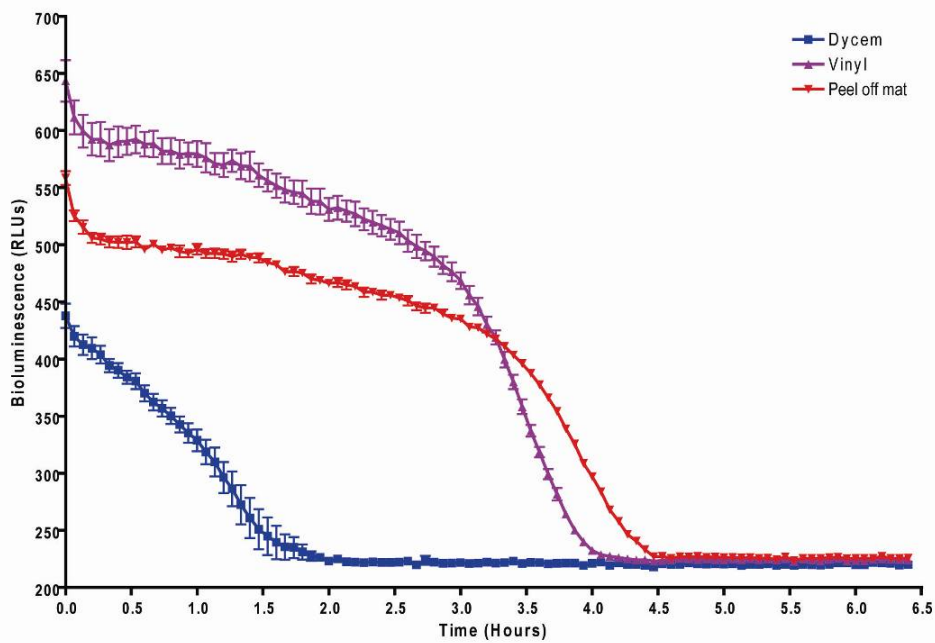


Figure 2. Light output from *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE suspended in nutrient broth inoculated onto a range of flooring surfaces. n = 3

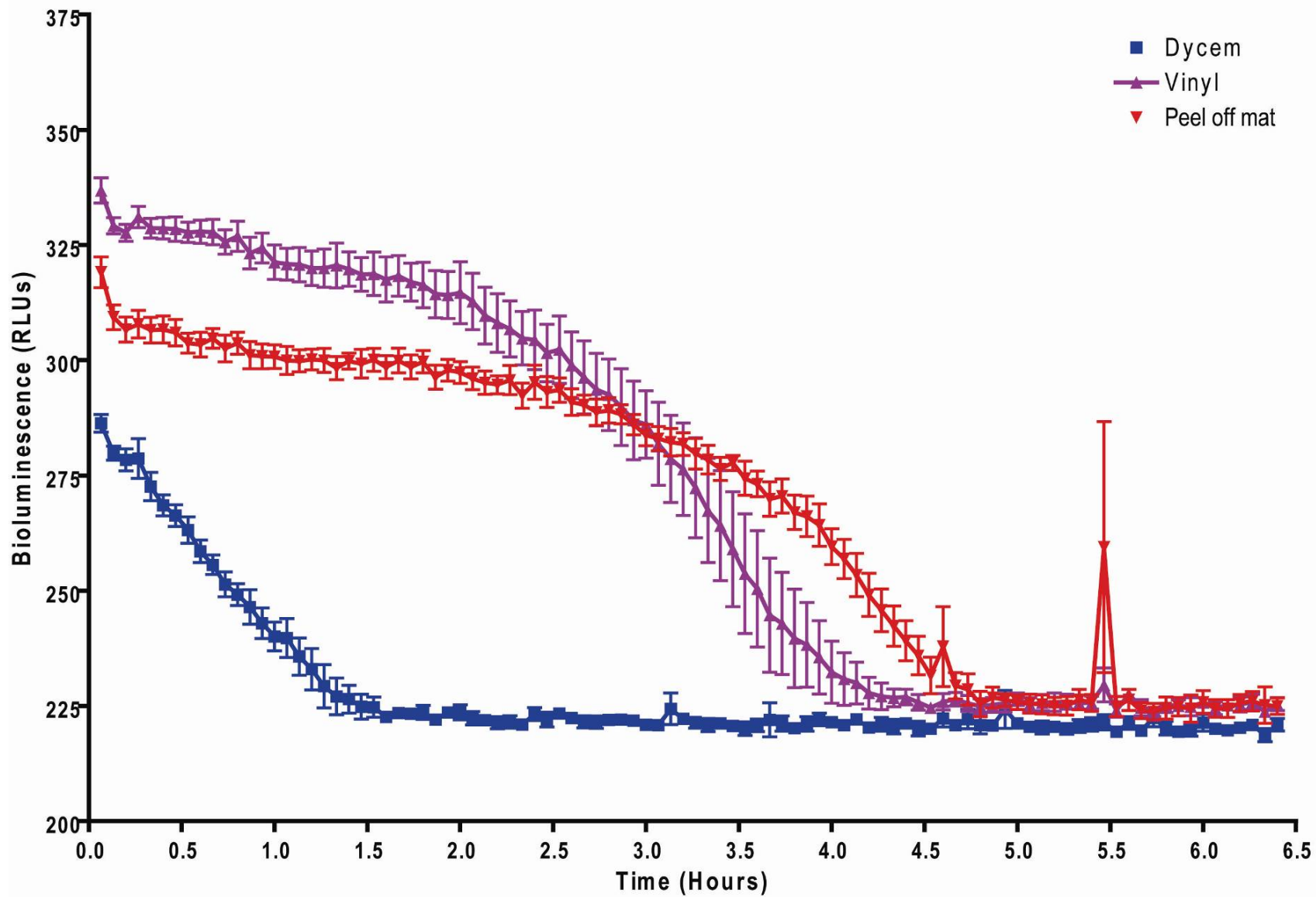


Figure 3. Light output from *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE suspended in nutrient broth inoculated onto a range of flooring surfaces. n = 3

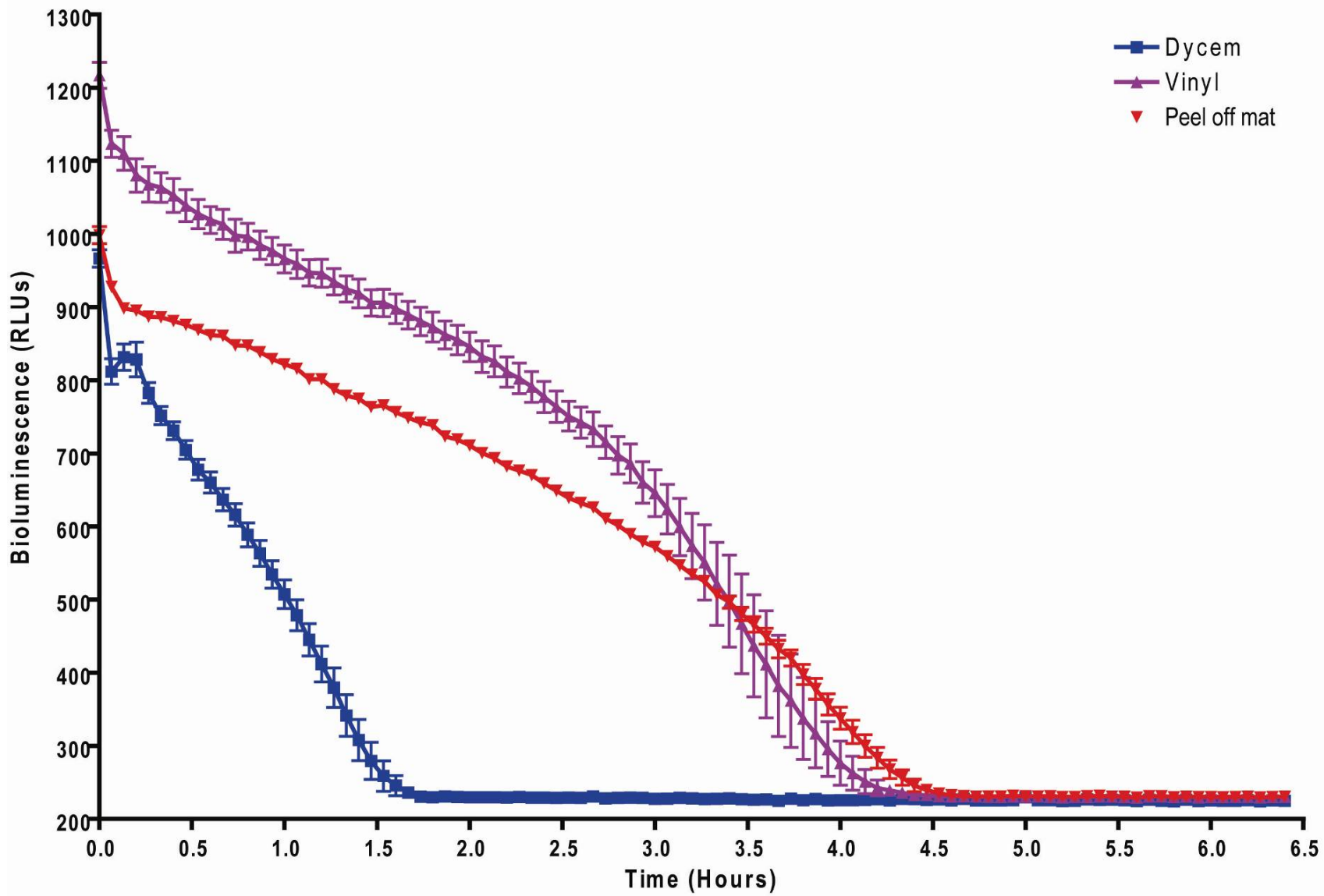


Figure 4. Light output from *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE suspended in nutrient broth inoculated onto a range of flooring surfaces. n = 3

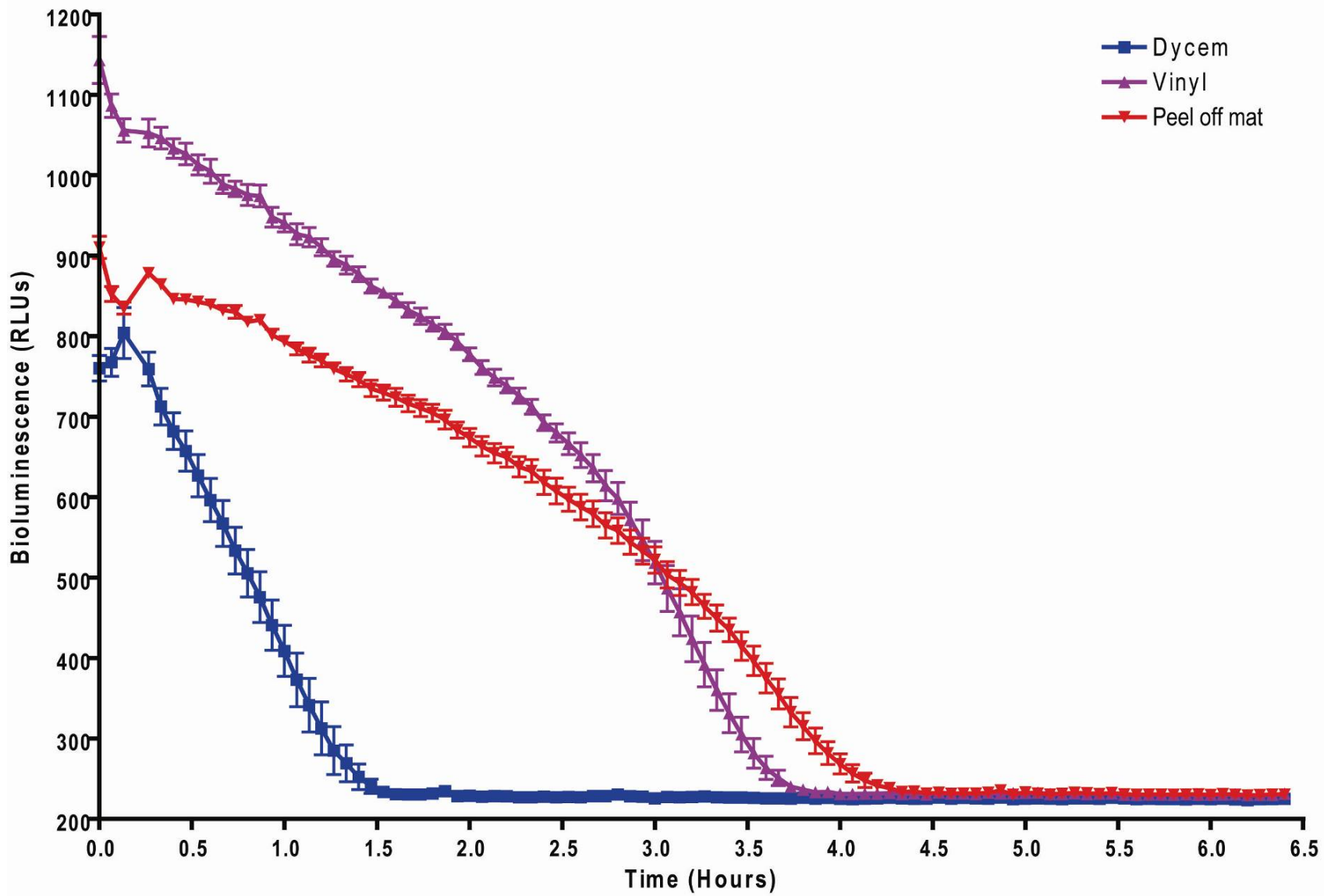


Figure 5. Light output from *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE suspended in nutrient broth inoculated onto a range of flooring surfaces. n = 3

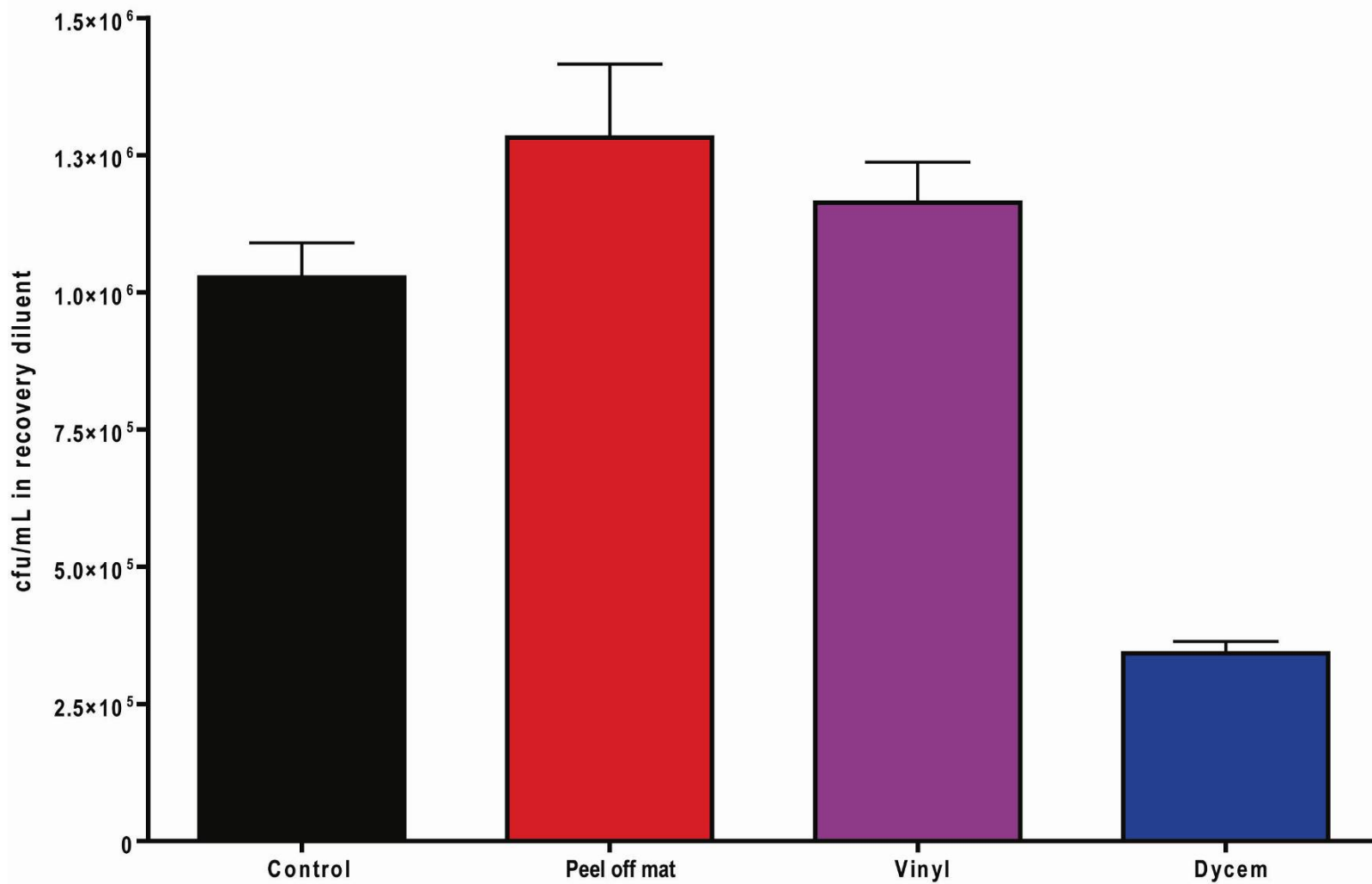


Figure 6. Recovery count from flooring samples inoculated with *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE for a period of three hours in undisturbed air. n=3

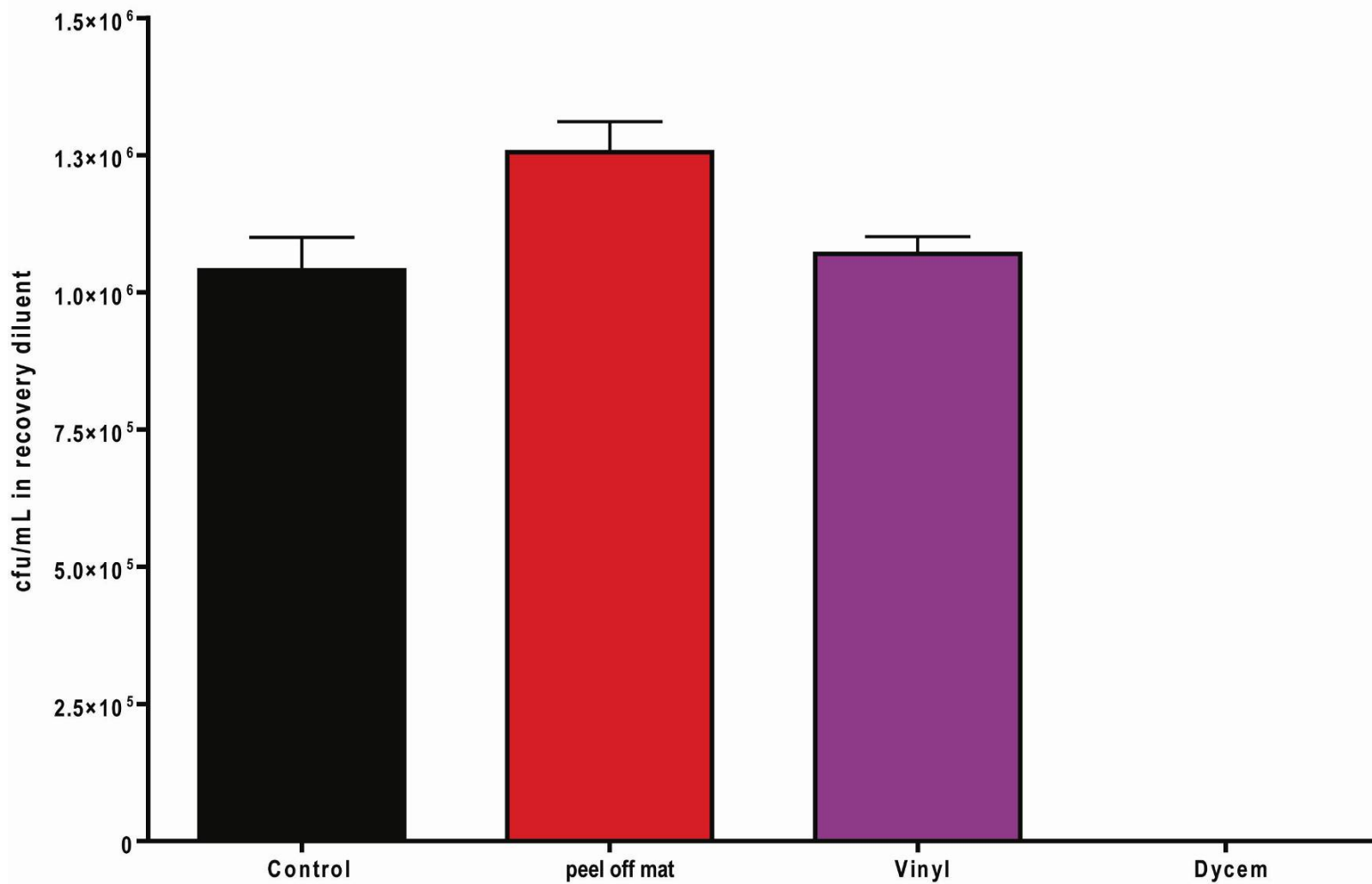


Figure 7. Recovery count from flooring samples inoculated with *S. enterica* sv Typhimurium pGLITE for a period of three hours in moving air. n=3