

R 2547 L

mykosen

Herausgeber und Schriftleiter: Hans Götz, Essen, Heinz Grimmer, Wiesbaden
Detlev Hantschke, Essen, Wolf Meinhof, München, Hans Rieth, Hamburg



11/1970

1. November

Laboratoire de bactériologie
Institut de botanique générale
Université de Genève

Action antimicrobienne de Remanex* et de ses constituants sur un actinomycète (*Streptomyces* sp.) ayant subi ou non une irradiation ultraviolette

JEAN-MARC POULIN et ELISABETH SCHORER

Introduction

Les produits désinfectants ont été étudiés principalement en application contre les bactéries, mais en revanche très peu contre les actinomycètes.

Pourtant, ces derniers représentent un groupe très important de micro-organismes, de par les rôles qu'ils jouent, tant dans le domaine de la microbiologie du sol que dans ceux de la pathologie, de la chimiothérapie (antibiotiques) et de la pollution des eaux.

Il nous a paru intéressant de tester l'activité antimicrobienne de quelques substances utilisées dans la désinfection sur un actinomycète du groupe des Streptomycètes.

Matériel et méthodes

a) Matériel

Les substances étudiées sont Remanex, l'hexachlorophène et le borate de phénylmercure.

Leur action a été expérimentée sur trois souches de Streptomycètes:

- a) une souche sauvage, isolée de l'eau du lac Léman (Suisse);
- b) deux souches provenant de spores de la première, mais qui avaient résisté à une irradiation ultraviolette. Cette expérience a pour but de savoir si une telle irradiation modifie la sensibilité des germes à l'égard des désinfectants par rapport à la souche non irradiée.

Origine de la souche utilisée

La souche qui a servi à ces tests a été isolée d'un échantillon d'eau brute du lac Léman, prélevé à la station de filtration du Prieuré à Genève. La technique employée fut celle de la filtration sur membrane millipore et dépôt de la membrane sur gélose nutritive.

La purification de la souche a été obtenue par triage en boîte de Pétri selon la méthode du quadrillage.

Nous n'avons pas procédé à une détermination précise de cette souche (que nous appelons dans ce travail «souche B : 3»), mais nous pouvons néanmoins affirmer qu'il s'agit d'un *Streptomyces* du groupe *Cinnamomeus*, éventuellement de *S. venezuelae*.

Irradiation aux UV

Le traitement aux ultraviolets a été effectué dans les conditions suivantes:

Nous avons préparé une suspension de spores en ajoutant à 3 tubes de culture sur gélose nutritive en biseau, ayant séjourné 8 jours à l'étuve à 37° C, 3 ml d'une solution 0,9 % de NaCl stérile additionnée de 0,2 % de Tween 80, en guise de mouillant. Après mise en suspension des spores, le liquide a été recueilli dans un tube stérile et la suspension immédiatement titrée par dilution et étalement sur gélose nutritive, contenant 0,5 % de glucose, 0,6 % de peptone, 0,5 % d'extrait de viande, 0,3 % d'extrait de levures et 1,5 % d'agar-agar.

La source d'UV était une lampe comportant un tube à vapeur de mercure fournissant une longueur d'onde de 2537 Å.

* Remanex® est un nouveau produit pour la désinfection des mains fabriqué par Zyma SA Nyon (Suisse), qui contient, dans un excipient approprié, 3,0 % d'hexachlorophène et 0,04 % de borate de phénylmercure.

Nous avons irradié 7 ml de suspension dans une boîte de Pétri stérile de 10 cm de diamètre. De cette manière, la couche de liquide n'excédait pas 1 mm d'épaisseur, ce qui permettait une bonne action des UV sur la totalité des spores.

La suspension a été placée à 25 cm de la lampe UV et agitée d'un mouvement circulaire pendant toute la durée de l'irradiation.

Nous avons fait des prélèvements de spores après 1, 2, 4, 6 et 10 min d'irradiation. Les échantillons prélevés ont été placés à l'obscurité en attendant d'être titrés, pour éviter une photo-réactivation. Les opérations de dilution et d'étalement sur gélose nutritive ont été réalisées en lumière rouge diffuse, immédiatement après le dernier prélèvement.

Les boîtes de Pétri ont été incubées 3 jours à 37° C à l'obscurité, puis nous avons procédé au comptage et à l'établissement de la courbe de survie (fig. 1, 2).

Tableau des résultats

Temps d'irrad. min.	Titre en spores/ml	Pour-cent de survivants	Pour-cent détruits dep. comptage précédent
Tém. 0	$3,72 \times 10^7$	100,00	0,0
1	$4,96 \times 10^5$	1,3	98,7
2	$1,0 \times 10^4$	0,027	98
4	$3,0 \times 10^3$	0,008	70
6	$1,7 \times 10^{3*}$	0,0046*	43*
10	$7,2 \times 10^2$	0,0019	57*

* = non significatif

Fig. 1. Nombre de spores vivantes et pour-cent de survivants après irradiation UV à 2537 Å à 25 cm, d'une suspension de spores de Streptomyète. Pour-cent de spores détruites d'un comptage à l'autre

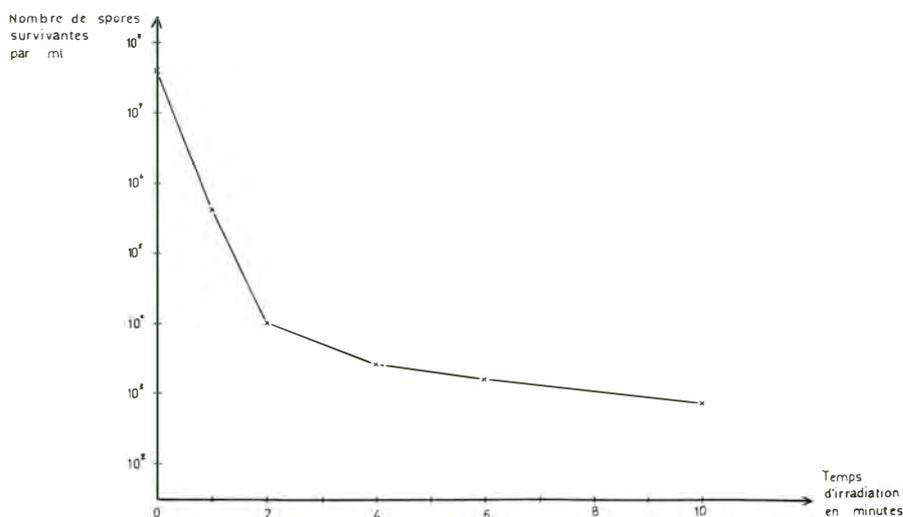


Fig. 2. Courbe de survie des spores d'un Streptomyète en fonction du temps d'irradiation UV (2537 Å; 25 cm)

b) Méthodes

Isolement de souches résistantes aux UV

Nous avons choisi arbitrairement plusieurs colonies issues de spores ayant résisté aux UV et les avons remises en culture sur différents milieux. Certaines de ces souches présentaient un aspect modifié par rapport à la souche non irradiée, notamment la perte de la faculté de sporuler, l'absence de mélanogénèse, ou, plus simplement, une croissance ralentie. D'autres, en revanche, ne différaient pas morphologiquement de la souche témoin sauvage.

Traitement aux désinfectants

Pour cette expérience, nous avons utilisé 4 types de solutions désinfectantes:

- 1° hexachlorophène en solution dans le polyéthylène-glycol 200 mélangé à 20 % d'H₂O dist. (= PEG);
- 2° borate de phénylmercure en solution aqueuse;
- 3° mélange des deux premiers en solution PEG;
- 4° Remanex dilué avec H₂O dist.

Dans les types de solutions 1, 2 et 3, les concentrations en désinfectants étaient les mêmes que dans Remanex.

Pour chaque type de solution, nous avons utilisé 2 dilutions différentes, déterminées expérimentalement, de manière à mettre en évidence d'éventuelles différences de sensibilité d'une souche à l'autre. On trouvera les titres de ces solutions dans la figure 3.

Désinfectant (abréviation)	Solvant	Solution d'emploi $1/_{20}$	Solution d'emploi $1/_{100}$
Hexachlorophène (H)	PEG	0,15 %	0,03 %
Borate de phényl-Hg (PHB)	H ₂ O	0,002 %	0,0004 %
H + PHB	PEG	H 0,15 % PHB 0,002 %	H 0,03 % PHB 0,0004 %
Remanex	Emulsion moussante; dilution dans H ₂ O	H 0,15 % PHB 0,002 %	H 0,03 % PHB 0,0004 %

Fig. 3. Solution désinfectantes utilisées, avec équivalents en pour-cent

Remarque. Pour favoriser la mise en suspension des spores dans la solution de NaCl avant le chargement des porte-germes (voir plus loin), nous avons utilisé 0,2 % de Tween 80, qui se trouve être l'inhibiteur spécifique de l'hexachlorophène. Toutefois, nous ne pensons pas que cela ait eu une influence fâcheuse sur les résultats de nos tests, pour deux raisons:

1° La concentration en Tween est faible, et une fois les porte-germes plongés dans les solutions désinfectantes, le Tween se trouve encore plus fortement dilué. Donc son action inhibitrice doit être pratiquement annulée.

2° Nous avons préparé les trois suspensions de spores (sauvage, UV 2' et UV 10') dans des conditions absolument identiques. En conséquence, s'il subsiste tout de même une action du Tween, celle-ci se reproduit fidèlement pour les trois souches et ne gêne donc pas dans la comparaison de leur sensibilité respective à l'hexachlorophène.

Nous avons employé la technique des porte-germes, qui possède l'avantage de permettre des temps de contact variables des spores avec les désinfectants.

Des morceaux de fil de 10 cm sont chargés de spores par immersion de 2 min dans une suspension préparée de la manière que nous avons déjà décrite. Ils sont ensuite mis à sécher pendant 2 h à l'étuve à 37° C. Chacune des 8 solutions désinfectantes reçoit alors 3 fils qui y séjournent selon des temps déterminés. Les fils sont ensuite rincés à 3 reprises dans des solutions 0,9 % de NaCl, puis introduits dans des tubes contenant 8 ml de milieu nutritif liquide. Après 10 jours d'incubation à 37 ° C, on note les résultats, en estimant la croissance à l'intérieur des tubes.

Nous avons fixé 3 temps de contact des spores avec les désinfectants:

- 1 min, ce qui correspond à un lavage sommaire des mains,
- 10 min, ce qui correspond à un lavage approfondi des mains,
- 45 min, ce qui permet d'observer le résultat d'une action rémanente des désinfectants.

Résultats

Nous avons noté les résultats sous la forme d'une estimation de la croissance dans les tubes ayant reçu les fils traités, de la manière suivante (fig. 4):

- forte croissance, nombreux flocons de bonne dimension (Ø = env. 3 mm): une colonne de 3 unités de haut
- bonne croissance, flocons assez nombreux et d'une dimension de l'ordre de 1 mm de Ø: une colonne de 2 unités de haut
- croissance faible à moyenne, petits flocons peu nombreux: une colonne de 1 unité de haut
- croissance très faible, 1 ou 2 flocons: une colonne de ½ unité de haut
- aucune croissance: un trait horizontal

Dans la mesure où cela était possible, nous avons donné une appréciation plus fine (2½ unités, 1½ unité).

Ces résultats donnent l'intensité de la croissance par rapport à de fils témoins ayant séjourné 45 min dans du NaCl 0,9 % et rincés de la même manière que les fils traités aux désinfectants. Ces fils témoins produisent un développement de flocons que nous traduisons par une colonne de 3 unités de haut.

Ces estimations ne sont pas quantitatives, car les actinomycètes ont un mode de croissance qui exclut toute mesure néphélométrique ou tout comptage en milieu liquide par des méthodes simples.

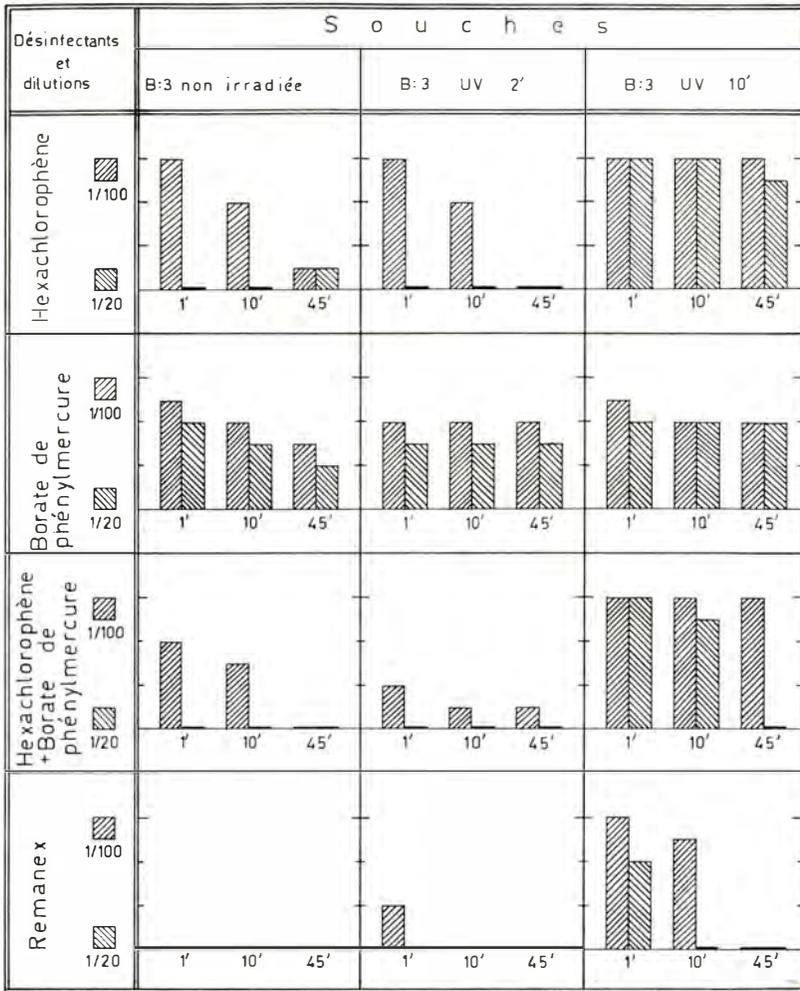
Discussion

a) Souche B : 3 non irradiée

Les résultats montrent une action plus forte de l'hexachlorophène que du borate de phénylmercure. Il ne faut pas perdre de vue cependant que les concentrations utilisées sont respectivement 20 et 100 fois plus faibles que celles des spécialités du commerce.

L'utilisation simultanée des deux désinfectants semble montrer une simple addition de leurs actions respectives.

Quant à Remanex, la formule de son excipient doit certainement permettre une adsorption meilleure des désinfectants sur les parois des spores, car l'action germicide est considérablement augmentée.



Croissance dans les tubes des spores traitées
aux désinfectants. La colonne de référence pour
le développement de spores non traitées est
haute de 3 unités :



Fig. 4. Tableau des résultats.
Traitement aux désinfectants

b) Souche B : 3 UV 2' (2 min d'irradiation)

La réaction de cette souche diffère peu de celle de la souche témoin non irradiée. Les quelques différences que l'on peut observer proviennent peut-être d'une certaine irrégularité dans le chargement des porte-germes, ou d'un facteur personnel d'observation. Néanmoins, il y a développement après contact de 1 min avec Remanex 1/100 et après 45 min avec le mélange de ses principes actifs 1/100.

c) *Souche B* : 3 UV 10' (10 min d'irradiation)

Cette souche montre une résistance remarquablement élevée au traitement désinfectant. On assiste même à un antagonisme entre le borate de phénylmercure et l'hexachlorophène, quand ils agissent ensemble, puisque la croissance des germes traités au mélange est, dans 5 cas sur 6, plus forte qu'après traitement au seul borate de phénylmercure. Paradoxalement, l'organométallique montre ici une meilleure action que l'hexachlorophène.

Quant à Remanex, il faut 10 min de contact avec la solution $1/_{20}$ ou 45 min avec la solution $1/_{100}$ pour éliminer la totalité des germes. Or, la suspension ayant servi à charger les porte-germes présentait un aspect tout à fait identique à celui de la suspension B : 3 sauvage.

Conclusions

Nous pouvons conclure que l'irradiation UV est susceptible de modifier la sensibilité des spores de Streptomycètes aux désinfectants. Cette modification va dans le sens d'une augmentation de la résistance.

Reste à savoir si l'irradiation induit des mutations qui se traduisent par une résistance plus grande aux désinfectants, ou si elle ne fait que révéler des germes préexistants, déjà résistants aux désinfectants et aux UV, en détruisant tous les autres. Pour cela, il conviendrait de réaliser l'expérience inverse: sélectionner des résistants aux désinfectants, puis établir leur courbe de survie à l'irradiation ultraviolette pour voir s'ils y résistent mieux que les germes ordinaires.

Cette expérience permet également de conclure que Remanex est un produit dont l'efficacité est excellente, même à très faible concentration et pendant un temps de contact très court (1 min), contre les spores de Streptomycètes, alors que les désinfectants qu'il contient, utilisés sans émulsion, montrent une efficacité réduite. Il est intéressant de noter qu'une catégorie de micro-organismes aussi particuliers que les Streptomycètes peut être parfaitement éliminée par l'emploi de Remanex.

Nos vifs et sincères remerciements vont à:

- Zyma SA Nyon, qui nous a aimablement fourni Remanex utilisé dans nos expériences;
- M. ROGER CORBAZ et M. PIERRE BURKARD, qui nous ont aidés de leurs conseils et suggestions.

Résumé

L'action antimicrobienne de Remanex Zyma et de ses constituants (borate de phénylmercure et hexachlorophène) a été expérimentée sur des spores d'une souche de *Streptomyces* sp., isolée des eaux du lac Léman (Suisse), soit:

- a) les spores de la souche sauvage;
- b) les spores d'une subculture préparée à partir d'un individu de la souche initiale qui a survécu à 2 min d'UV germicides;
- c) dito, mais 10 min d'UV germicides.

Dans tous les cas, les résultats montrent que Remanex possède une efficacité nettement plus forte que ses principes actifs isolés ou associés, mais sans excipient.

D'autre part, les spores qui ont survécu à la plus forte dose d'UV administrée ont fourni une subculture dont la résistance aux traitements désinfectants décrits dans ce travail s'est révélée supérieure à celle de la souche non ou faiblement irradiée.

Zusammenfassung

Die antibakterielle Wirkung von Remanex Zyma und seinen Bestandteilen (Phenylquecksilberborat und Hexachlorophen) wurde an Sporen eines aus dem Genfer See (Schweiz) isolierten Stammes *Streptomyces* sp. untersucht, und zwar an:

- a) Sporen des wilden Stammes;
- b) Sporen der Subkultur eines Keims der Primärkultur, der eine 2 min lange keimtötende UV-Bestrahlung überlebte;
- c) Sporen der Subkultur eines Keims der Primärkultur, der eine 10 min lange keimtötende UV-Bestrahlung überlebte.

Remanex erwies sich in allen Fällen als weitaus wirksamer als seine einzeln oder assoziiert ohne Excipients vorliegenden aktiven Wirkstoffe.

Diejenigen Sporen, die die höchstdosierte UV-Bestrahlung überlebten, entwickelten Kolonien, deren Resistenz gegenüber den in dieser Arbeit beschriebenen Desinfizienzien größer als diejenige der nicht oder schwach bestrahlten Kulturen war.

Summary

The antimicrobial activity of Remanex Zyma and its components (phenylmercuric borate and hexachlorophene) was tested on the spores of a strain of *Streptomyces* sp., isolated from the waters of the lake of Geneva (Switzerland), namely:

- a) the spores of the wild strain;
- b) the spores of a subculture prepared from a component of the original strain which survived 2 min of germicidal UV irradiation;
- c) ditto, but with 10 min of germicidal UV irradiation.

Remanex was shown in all cases to have a definitely more powerful action than either of its components alone or in combination without excipient.

The spores which survived the higher dose of irradiation formed a subculture with a higher resistance to the disinfectants described in this study than the non- or weakly-irradiated strain.

Bibliographie

1. GASCHEN, M.: Etude in vitro d'une nouvelle préparation destinée à la désinfection rémanente des mains. *Path. & Microbiol.* 29, 811—824 (1966).
2. † HAUDUROY P., PROD'HOM L. S., ROUSSIANOS D., TANNER F.: Du lavage des mains dans un service de pédiatrie; de l'utilité d'associer un désinfectant organo-mercuriel à un hexachlorophène. *Schweiz. med. Wschr.* 98, 15, 584—587 (1968).
3. HEDGECOCK L. W.: Antimicrobial agents. *Med. Techn.* (Lea & Febiger, Philadelphia) 3, 232 p. (1967).
4. HOLLAENDER A.: (éd.): Radiation biology. Vol. II: Ultraviolet and related radiations. (McGraw-Hill Book Company Inc. 1955).
5. HÜTTER R.: Zur Systematik der Actinomyceten. 9. Mitteilung: Streptomyceten mit cinnamomeus Luftmycel. *Zbl. Bakt., II Abt.* 117, 603—661 (1964).
6. LECHEVALLIER H. A., LECHEVALLIER M. P.: Biology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 21, 71—100 (1967).
7. POULIN J. M.: Isolement d'actinomycètes de l'eau; sensibilité aux rayons ultraviolets et à divers désinfectants. Laboratoire de bactériologie, Institut de botanique générale, Genève. Travail de diplôme, non publié (1969).
8. REDDISH G. F.: Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization. 841 p. (Lea & Febiger, Philadelphia 1954).
9. Remanex® Zyma: Désinfectant des mains à action polyvalente. Plaquette d'information publiée par Zyma Nyon.
10. WAKSMAN S. A.: The actinomycetes; their nature, occurrence, activities and importance. *Ann. Cryptogam. et Phytopath.* (Waltham, Mass. USA) 9, 230 p. (1950).

Adresse des auteurs: Laboratoire de Bactériologie, Institut de Botanique Générale, Université, Place de l'Université, CH-1211 Genève 4, Suisse