

TD n° 1

La stérilisation

I- Introduction

En microbiologie, on doit travailler en conditions stériles pour 2 raisons :

- Pour ne pas contaminer nos échantillons avec d'autres microorganismes ;
- Pour que nos échantillons ne nous contaminent pas surtout lorsque l'on travaille avec des microorganismes



Protéger l'échantillon et nous même de ces échantillons.

II- Définition

La **stérilisation** est une opération qui consiste à détruire (éliminer) tous les microorganismes (bactéries, virus, champignons, parasites) présents sur un objet, une surface ou dans un produit.

Un produit est biologiquement stérile, lorsqu'il ne contient plus de microorganismes revivifiables (microorganismes non vivants ou pouvant donner une forme vivante qui était en dormance).

Les microorganismes se trouvent dans un milieu sous deux états :

- Végétatif qui est la forme sous laquelle les cellules se reproduisent/ se multiplient.
- Sporulant qui est la forme de résistance (c'est une forme dormante formée en conditions nutritionnelles défavorables).

Donc le but de la stérilisation est d'éliminer les 2 formes de microorganismes.

III- Les moyens de stérilisation

On peut les classer selon le mécanisme d'action

- **Destruction**
 - **Moyens physiques**
 - ✓ La chaleur (température)
 - ✓ Le rayonnement (énergie du rayonnement)
 - **Moyens chimiques**
 - Les désinfectants (alcool, javel)
- **Elimination** :
 - ✓ La filtration (selon la taille)

III. 1. Stérilisation par la chaleur

III.1.1. Principe de fonctionnement : il s'agit du chauffage de l'air entraînant la destruction par hydrolyse et dénaturation protéique.

III.1.2. Sensibilité des microorganismes à la chaleur

A- Facteurs liés aux microorganismes

- Espèce microbienne : sensibilité à la chaleur variable selon l'espèce.

- Etat des germes :
 - ✓ Bactéries forme végétative détruites à $T^{\circ} = 52$ à 60 °C en milieu aqueux pendant 5 à 60 mn
 - ✓ Spores : Plus résistantes que les formes végétatives Nécessitent des températures plus élevées pour les détruire
- Nombre de germes.
- B- Facteurs liés au milieu
 - Nature du milieu et présence de principes actifs dans le milieu : oriente le choix d'un traitement thermique Ex : Carbonate acide de sodium et le salicylate de sodium (Pouvoir bactéricide à chaud)
 - pH du milieu
- C- Facteurs liés aux modalités de destruction
 - Température
 - Temps

III.1.3. Types de stérilisation par la chaleur

Les méthodes de stérilisation thermique sont les plus courantes. On distingue les procédés à la chaleur « sèche » ou « humide »

- Stérilisation par chaleur sèche

La chaleur sèche détruit les microorganismes en provoquant une agitation des molécules d'eau et destruction/dénaturation des molécules biologiques (ADN, ARN, protéines...).

Cette technique est utilisée pour la stérilisation de matériel relativement résistant aux températures élevés ou inadaptés à la stérilisation à la vapeur d'eau, tels que, matériaux oxydables, la verrerie vide, porcelaine, instruments métalliques,

Elle ne convient pas pour le caoutchouc, milieux de culture liquides, plastiques.

Sur le plan pratique, différentes combinaisons usuelles de température et de temps peuvent être appliquées

Tab. Exemples de couplés ($T^{\circ}C$ /Temps) utilisés pour une stérilisation au four Pasteur

$T^{\circ}C$	140°C	150°C	160°C	170°C	180°C
Temps	3h	2h30	2h	1h30	30-45min

Elle est produite au laboratoire par :

- Four Pasteur (four Poupinel) : C'est un four-étuve électrique thermostaté à air chaud et sec. Cet appareil n'est utilisé que pour la stérilisation de la verrerie préalablement nettoyée et séchée ou de matériels métalliques (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures
- Flambage : Le passage dans la flamme (bec BUNSEN) de la surface du petit matériel non inflammable assure une parfaite stérilisation. On stérilise de cette façon les fils de platine, tube à essai et les pipettes Pasteur.

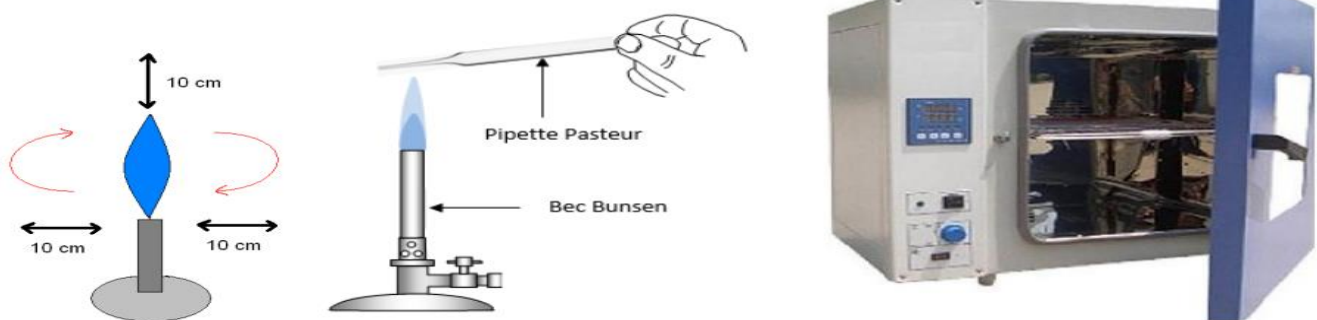


Fig. flambage d'une pipette et four Pasteur.

- Stérilisation par chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités :

a. Stérilisation à l'autoclave (appareil indispensable dans un laboratoire de microbiologie).

Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau chaude à une température et une durée qui varient en fonction du milieu et du volume des récipients. Ce procédé tue toutes les cellules végétatives et les endospores.

Sur le plan pratique, différentes combinaisons usuelles de température, de temps et de pression peuvent être appliquées.

La stérilisation des milieux de cultures, des autres solutions et matériels sensibles à la chaleur sèche se fait en général selon un cycle standard de 15 à 20min à 121°C dans une atmosphère saturée en vapeur, ce qui assure une destruction totale de toute forme de vie (végétative, et même sporulée)

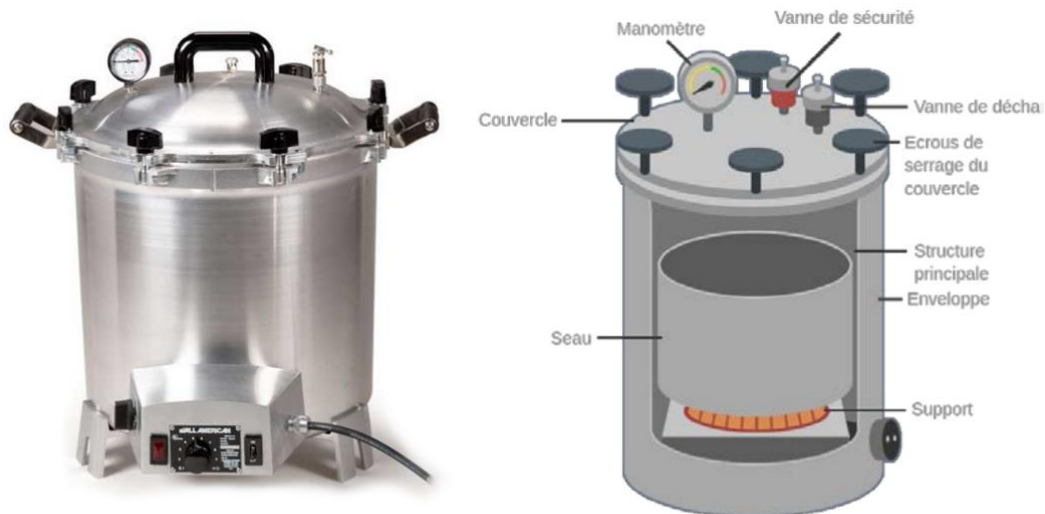


Fig. Schéma d'un autoclave

b. Pasteurisation

C'est un traitement à chaud de liquides, ayant pour but de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes non sporulés et de réduire significativement la flore végétative présente dans un produit. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c. Tyndallisation (du nom Tyndal, son inventeur)

Est une technique de stérilisation à la chaleur humide, appliquée à des produits thermosensibles, pour éliminer les formes végétatives et spores sans l'emploi de températures excessives.

C'est une série de 3 chauffages brefs à des températures de 70°- 90 C à intervalles réguliers, suivi de deux temps d'incubation de 24h, dans leur ensemble réparti en trois jours. Ceci afin de laisser aux formes résistantes la possibilité de germer pour les tuer au chauffage suivant.

III.2. La stérilisation par filtration

C'est une technique qui consiste à faire passer un liquide ou de l'air à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm à 0,45 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre. Cette technique est intéressante lors d'utilisation de produits thermolabiles comme certains acides aminés, vitamines, hormones de croissance, acides nucléiques et une bonne partie des antibiotiques. Par cette technique, les micro-organismes ne sont pas détruits mais retenus par un filtre.

Exemple d'utilisation de filtration :

- 1- Dans les processus de traitement des eaux usées ou de consommation.

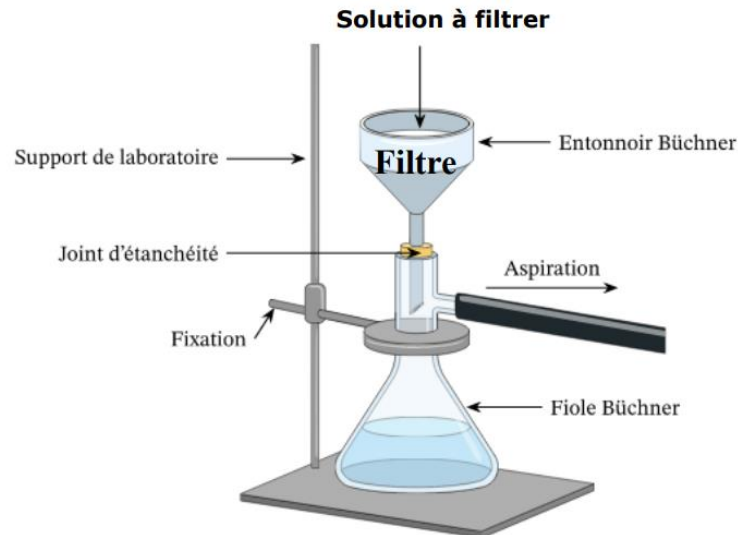


Fig. Dispositif simple de filtration stérilisante.

2- En microbiologie, on doit travailler en conditions stériles donc on va filtrer l'air dans la zone de travail. On travaille sous hotte à flux laminaire ou PSM (poste de sécurité microbologique) équipés de filtres qui arrêtent le passage des microorganismes.

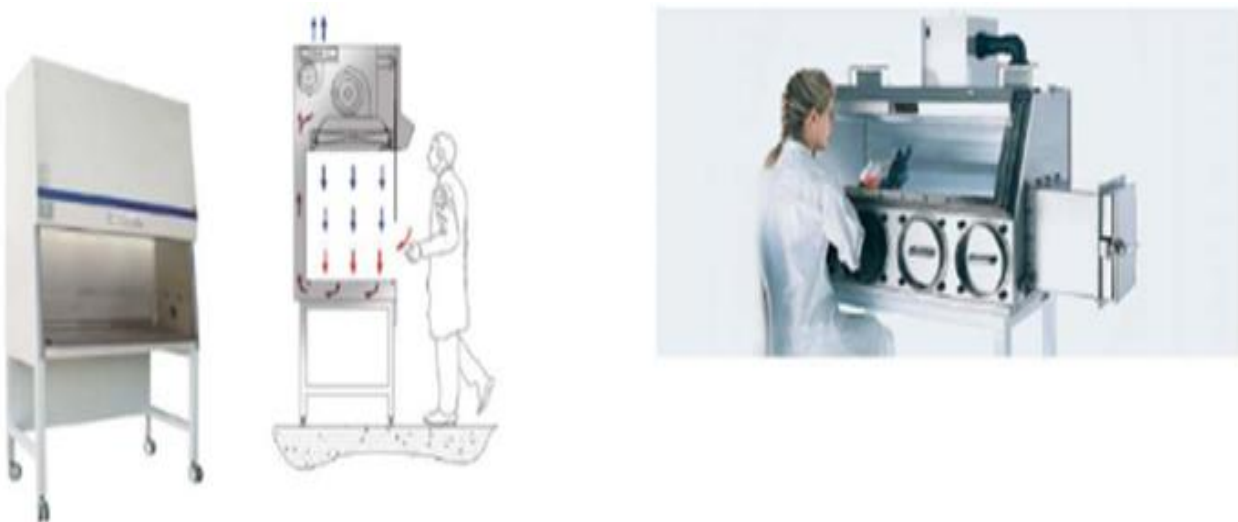
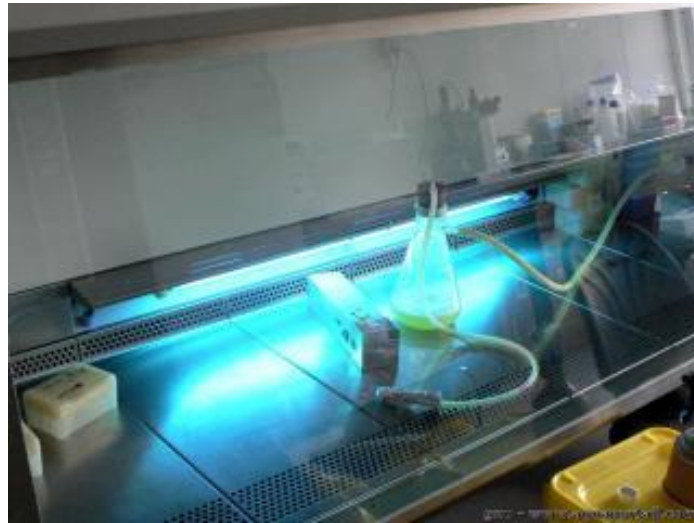


Fig. Poste de sécurité microbologique

III.3. La stérilisation par les radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement ultraviolet germicide est une méthode de stérilisation utilisant la lumière ultraviolette à la longueur d'onde UV, qui modifie l'ADN ou l'ARN des microorganismes et par conséquent les empêche de se reproduire ou d'être nuisibles.

- Utilisation en virologie, cultures cellulaires et préparation des produits pharmaceutiques et des milieux de culture.
- D'autres radiations (rayons X) peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et pour la conservation de certains produits alimentaires.



Exemple d'appareil de stérilisation par UV

III.4. La stérilisation par les agents chimiques

La stérilisation chimique repose sur l'utilisation de produits chimiques tels que les agents oxydants, les composés halogénés et les agents alkylants. Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

Les substances chimiques ont la capacité de détruire les micro-organismes en perturbant leurs structures cellulaires essentielles, en interférant avec leurs processus métaboliques ou en provoquant la coagulation de leurs protéines.

Les agents chimiques utilisés pour la stérilisation peuvent être classés en 2 catégories principales :

3- Les agents oxydants, tels que l'eau de Javel (hypochlorite de sodium) et le peroxyde d'hydrogène, agissent en oxydant les composants cellulaires des micro-organismes, ce qui entraîne leur destruction. Ils sont efficaces contre un large éventail de micro-organismes, y compris les bactéries, les virus et les champignons.

4- Les agents alkylants, tels que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, réagissent avec les acides aminés et les bases nucléiques des micro-organismes, provoquant une altération de leur structure et de leur fonction. Ces agents sont couramment utilisés pour la stérilisation d'instruments médicaux et de matériaux sensibles à la chaleur, car ils sont moins corrosifs que certains autres agents chimiques.