

TP N° 1. PARTIE II: Stérilisation et désinfection

La **destruction des microorganismes** est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés.

1) La stérilisation

Est une opération appliquée **sur des substances inertes** permettant une **élimination durable** de **tous les microorganismes** sous leurs **formes végétatives** ou leurs **formes sporulantes** et aussi **élimination des virus**.

Les **objets stérilisés** doivent être **protégés** jusqu'à l'utilisation suivante pour **éviter une recontamination**.

La **technique utilisée sera choisie** en fonction de : **la nature du produit ou du matériel** à stériliser, le prix de revient et les possibilités locales d'utilisation.

a- Stérilisation par la chaleur sèche : (oxydation des protéines microbiennes)

a-1/ Le flambage : est basé sur l'emploi de **la flamme** du **bec bunsen**, utilisé pour la stérilisation de l'air de la zone du travail et ainsi pour la **stérilisation extemporanée** (pour utilisation immédiate) du matériel exemple : le fil de platine d'une anse, col des tubes et des flacons, extérieur des pipettes Pasteur.

a-2/ Le four Pasteur : **L'air est chauffé** à des températures contrôlable pendant un temps variable suivant le volume du matériel à stériliser : de **140° à 210° pendant 30 à 180** minutes. La matière organique est détruite à cette température. Il peut être utilisé sur le **matériel métallique**, **la porcelaine** (filtres, mortiers, ...), **la verrerie** sauf verreries de précision qui peuvent subir des déformations entraînées par la dilatation. En revanche, il est inutilisable sur le caoutchouc, les matières plastiques, milieux de culture et tous les liquides.

La verrerie à stériliser doit être **propre** et parfaitement **sèche**, éventuellement **bouchée** avec du coton et **emballée** dans du papier solide. Le matériel ainsi **stérilisé** sera laissé dans le four jusqu'à son refroidissement complet, puis **stocké à l'abri de la poussière**.

b- Stérilisation par la chaleur humide : (dénaturation des protéines microbiennes)

L'action conjuguée de l'eau et de la température amène la dénaturation des protéines des microorganismes et par conséquent la coagulation de ces protéines ; ce qui entraîne, pour eux, l'impossibilité de se reproduire et la mort.

b-1/ Autoclavage : (la plus employée et la plus efficace)

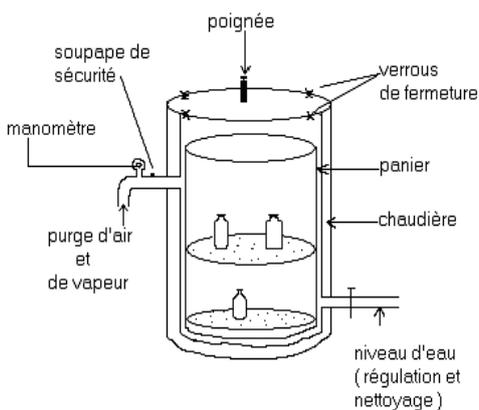
C'est une technique appliquée dans l'**Autoclave** qu'est une chaudière fonctionnant en vase clos dont le principe de fonctionnement est le suivant : L'eau bout à 100° C sous une pression atmosphérique normale (760 Hg ou 1006 millibars), Si la pression augmente, la température d'ébullition s'élève aussi.

C'est une technique de stérilisation dans **une atmosphère de vapeur d'eau exempte d'air**, dans tel cas, tous les germes y compris les spores sont tués en **15-20 min à 115-121°C, 1.5 – 2 atm**

Il est utilisé pour stériliser les **milieux de culture neufs non thermolabiles**, **tous les liquides**, matériel en **plastique et en caoutchouc**.

Le matériel à stériliser est déposé dans le panier métallique dont on doit vérifier le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage résistant.

Les **flacons et les tubes** ne doivent **pas être complètement remplis** et **pas fortement serrés**.



L'AUTOCLAVE

- Couvercle maintenu par des boulons à oreille.
- Panier contenant les objets à stériliser.
- Manomètre.
- Soupapes : une pour la purge et une pour la sécurité (surpression)
- Dispositif de chauffage : électricité ou gaz.

b-2 / Pasteurisation : (ce n'est pas une stérilisation, les spores ne sont pas tuées)

Elle peut se faire en bouteilles ou en vrac dans des **bains marie**.

Elle est toujours **suivie d'un refroidissement rapide**.

Le produit est soumis à une aspersion d'eau de plus en plus chaude, jusqu'à 65-75°C et séjourne à cette température pendant 20 à 30min, puis il est refroidit par de l'eau de plus en plus froide. On distingue la **pasteurisation basse** (chauffage à 65°C pendant 30 min) et la **pasteurisation haute** (chauffage à 85-90°C pendant 20 à 30 secondes). Cette méthode est utilisée **pour les aliments liquides** (lait) ou les boissons (jus, cidre).

b-3/ Tyndallisation : (stérilisation à usage très limité)

Elle consiste en **chauffage discontinu** dans le **bain marie** à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas) suivis de refroidissements. Au cours de ce traitement, les **bactéries perdent leur aptitude à sporuler**.

Actuellement, le procédé est réalisé en une série de **3 chauffages de 1h à 70-80°C, séparées par un intervalle de 24h à température ambiante**, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi de température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant des **substances thermolabiles** et de **forte viscosité** qui ne peuvent être stérilisées par filtration, comme le sérum, œuf...

c- Stérilisation par la filtration

Elle consiste à faire passer un liquide à travers une substance poreuse qui retient les éléments solides et les bactéries en suspension contenus dans ce liquide. Cette méthode est utilisée pour les **milieux thermolabiles** et de **viscosité faible** (vitamines, certains médicaments). On utilise alors, selon le cas, les **bougies de porcelaine** (type Chamberland), les **filtres de verre** poreux (verre fritté N°5 arrête de nombreuses bactéries) ou les **membranes filtrantes** à usage unique, de type Millipore ou Sertorius.

La filtration n'est **stérilisante** qu'avec des **filtres** dont la porosité est **inférieure à 0,2 µm**.

Les **virus** où leur taille est **< 0,1 µm** ne sont **pas retenus par les filtres**.

d- Stérilisation par les radiations

Les radiations peuvent être : ionisantes (**radio activité**) ou non-ionisantes (**rayons UV**).

d-1/ Radiations ionisantes (rayons X,...) : leur longueur d'ondes est ≤ 10 nm, utilisables seulement en condition spéciales puisque elles sont **trop dangereuses**. Elles peuvent servir pour la stérilisation, des **boîtes de Pétri en plastique**, médicaments non autoclavables et non filtrables, exp : vaccins et antibiotiques...

d-2/ Radiations non ionisantes (Ultra-Violet) : leur longueur d'ondes est située entre celle des rayons X et celle de la lumière visible ; c'est-à-dire entre 15 et 385 nanomètres.

On utilise généralement un rayonnement entre **200 et 280 nm** (activité maximum : 280nm) La stérilisation par les UV est utilisée au laboratoire pour la décontamination de **l'air** et des **paillasse** situées **sous la hotte à flux laminaire**, le rayonnement n'agit que de façon directe et **sa pénétration dans le produit ou le matériel** à stériliser **est faible**.

2) La désinfection

C'est l'élimination des formes végétatives des microorganismes sans ou peu d'effets sur les spores bactériennes. Pour ce faire, des **produits chimiques** sont utilisés, généralement pour la désinfection des salles et plans de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés.

Elle s'effectue grâce aux **antiseptiques = toxicité modérée (utilisés sur les **tissus vivants** ; exp: alcool à 70°, solutions iodées, eau oxygénée, eau iosinée, lotions,...) ;

Et aux **désinfectants = toxicité élevée (utilisés sur les **substances inertes** ; exemple: dérivés chlorés (eau de Javel), dérivés phénoliques (crésyl), Formol,...). Selon l'état physique, il existe :

☞ Les désinfectants liquides :

- **L'éthanol** : pour la désinfection des paillasse et des instruments.
- **L'hypochlorite de sodium (eau de Javel)** : utilisé dilué au $\frac{1}{4}$ dans les bacs destinés à recevoir les lames utilisées, ou en pissette pour la désinfection des paillasse et des sols.
- **Les savons et les détergents.**

☞ Les désinfectants gazeux :

- **Formol**: la vapeur d'une solution chauffée de formol est utilisée pour désinfecter les pièces et **les étuves**. L'ammoniac aussi peut être utilisé en combinaison pour diminuer la toxicité des vapeurs.
- **L'oxyde d'éthylène** : en industrie, il est utilisé pour la désinfection de certains **matériaux en plastique à usage unique**, exp : seringues, emballage,...