

Chapitre VI. Stérilisation

I/ Introduction

La destruction des microorganismes ou stérilisation 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. Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés : on utilise essentiellement des méthodes physiques.

Dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques ou chimiques). Il faut opposer la stérilisation qui est la destruction totale des germes, à la désinfection qui est une destruction plus grossière.

La loi de destruction des microorganismes est de type logarithmique. Le nombre d'individus tués est lié à la population et au temps d'exposition. Du fait de la loi de destruction, il est nécessaire de réduire au maximum le nombre de germes présents avant stérilisation par l'emploi de matériel propre et peu pollué, de stériliser pendant un temps relativement long, de vérifier la destruction des germes, d'établir et d'utiliser éventuellement un barème de stérilisation.

II - STÉRILISATION PAR LES MÉTHODES PHYSIQUES

A - STÉRILISATION PAR LA CHALEUR

1 - LE FLAMBAGE

Il est basé sur l'emploi du bec Bunsen. Cette méthode est utilisée pour la stérilisation extemporanée (pour utilisation immédiate) du matériel de manipulation : extrémité de l'öse, extérieur des pipettes Pasteur et pipettes graduées, col des tubes

à essai, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers et flacons divers, étaioirs ...

Il est à noter que le bec Bunsen, réglé avec une flamme bleue, la plus chaude, crée une zone de stérilité d'un diamètre d'environ 20 cm, par ascendance de l'air de cette zone. Toutes les manipulations d'ouverture de tubes et boîtes de culture, d'ensemencement, devront être réalisées dans ce diamètre. Pour que cette zone soit effectivement stérile, les courants d'air et déplacements de personnes sont à proscrire.

2 - LE FOUR PASTEUR

C'est un four - étuve à air chaud et sec. Il est utilisé pour la stérilisation de la verrerie vide (tubes à essai, boîtes de Pétri, tubes à culture et bouchons, pipettes Pasteur et récipients divers).

La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage de :

- 30 minutes à 1 heure à 170° - 180°C ou
- 2 heures à 160°C ce qui a pour but d'éviter le brunissement du coton.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières. Pour ces opérations, compte tenu des températures relativement élevées, il est conseillé d'utiliser le plus possible de la verrerie de type "pyrex".

3 - L'AUTOCLAVE

C'est un appareil très performant qui est indispensable dans une unité de microbiologie. Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie.

Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 100° à 130°C, pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients.

En milieu saturé d'humidité et sous pression, la stérilisation s'opère à des températures inférieures à celles qui sont nécessaires en milieu sec.

Le matériel à stériliser est déposé dans les paniers métalliques de l'autoclave dont on aura vérifié le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton (éviter de le prendre avec les doigts - utiliser de préférence une pince) et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage très résistant.

Pour la suite des opérations : mise en chauffe, jet de vapeur, montée de pression, lire attentivement la notice du constructeur.

Ces appareils étant relativement chers, on peut utiliser une cocotte-minute spécialement achetée et réservée à cet usage. Les températures atteintes ne dépassant pas 115°C, les temps de chauffe seront prolongés de la moitié du temps nécessaire en autoclave.

Attention à prendre un modèle suffisamment haut, pouvant accepter les tubes de culture dans leur galerie métallique.

4 - AUTRES MÉTHODES

Certains milieux de culture fragiles (comme les milieux au désoxycholate) ne supportant pas les températures élevées, on procède à une ébullition à 100°C.

PASTEURISATION

La pasteurisation est toujours suivie d'un refroidissement rapide. Elle peut se faire en bouteilles ou en vrac. Dans le premier cas, utilisé essentiellement pour la bière, le cidre ou les jus de fruits, la boisson est mise en bouteilles ; celles-ci sont capsulées puis

soumises à une aspersion d'eau de plus en plus chaude, jusqu'à 65 - 75°C; elles séjournent à cette température pendant 20 à 30 minutes, puis elles sont refroidies par de l'eau de plus en plus froide.

La pasteurisation en vrac, généralement utilisée dans le cas du lait, peut se faire de deux façons : dans la pasteurisation basse, le lait est chauffé à 60 - 70°C pendant 30 minutes, ce qui nécessite des récipients de volume important ; dans la pasteurisation haute, la plus utilisée en France, le lait est chauffé à 85 - 90°C pendant 20 à 30 secondes.

Cette opération se fait dans des appareils à plaques ou à tubes. L'appareil se divise en 3 parties : l'échangeur, dans lequel le lait froid se réchauffe en échangeant de la chaleur avec le lait pasteurisé ; le pasteurisateur proprement dit; et le réfrigérant, où le lait pasteurisé, qui a déjà été refroidi par le lait froid, va se refroidir encore en échangeant sa chaleur d'abord avec de l'eau froide, puis avec de l'eau glacée.

TYNDALLISATION

John TYNDALL : physicien irlandais (Leighlin-Bridge 1820 - Hinhead, Surrey, 1893). Il a découvert le phénomène de regel de la glace (1871), grâce auquel il a expliqué la marche des glaciers, ainsi que l'effet qui porte son nom.

Il a imaginé une méthode de stérilisation qui consiste en chauffages discontinus à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas), suivis de refroidissements. On admet qu'au cours de ces périodes de chauffage discontinu, les bactéries perdent leur aptitude à sporuler.

Actuellement, la tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1h. à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles

contenant sérum, œuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration.

Dans le cas de son utilisation, il faut veiller à la protection des cotons, car l'humidité excessive entraîne des contaminations.

FLAMBAGE A L'ALCOOL

Il est utilisé pour la stérilisation de matériel de manipulation en verre, ou la désinfection des paillasse. Attention, opération dangereuse !

B - STÉRILISATION PAR FILTRATION

Cette méthode est utilisée pour les milieux sensibles à la chaleur, mais n'est possible que lorsque la viscosité de ces milieux est faible. On utilise alors, suivant le cas, les bougies de porcelaine (type Chamberland), les filtres de verre poreux (le verre fritté N°5 arrête de nombreuses bactéries) ou les membranes filtrantes à usage unique, de type Millipore ou Sartorius.

Ces dernières sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires.

C - 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 n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. Des instruments ou des récipients tels que les boîtes de Pétri peuvent être stérilisées de la sorte.

D'autres radiations (rayons X...), peu utilisées, peuvent cependant servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique : stérilisation par ionisation.

II - STÉRILISATION PAR DES AGENTS CHIMIQUES

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles et plans de travail et pour la destruction des germes portés par des

instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué, dans nos laboratoires, pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

1) LES ANTISEPTIQUES LIQUIDES

L'alcool éthylique à 60% pour la désinfection des paillasse et des instruments. Mais certains germes étant résistants, la désinfection n'est pas toujours évidente.

L'hypochlorite de sodium (eau de Javel) est utilisé dilué au 1/4 dans les bacs destinés à recevoir les lames usagées, ou en pissette pour la désinfection des mains, des paillasse et des sols. Rappelons que l'eau de Javel est toujours largement employée en milieu hospitalier, dans certaines industries et à domicile.

Les savons et détergents agissent surtout par leur pouvoir mouillant, ce qui facilite l'élimination des germes.

Dans le commerce, des produits antiseptiques (Désogerm sp. par exemple) sont très efficaces sur les bactéries et sans danger pour l'homme. On les emploie pour désinfecter le petit matériel, les appareils de fabrication en industrie, mais aussi les paillasse et les mains après manipulations, dans les cabinets médicaux et dentaires, les laboratoires ...

2) LES ANTISEPTIQUES GAZEUX

Les vapeurs d'une solution chauffée de formol sont utilisées pour désinfecter les pièces et les étuves. Dans les années 70, les salles de classe étaient désinfectées par ce procédé. Au Centre hospitalier de Haguenau, nous avons observé une enceinte à vapeur de formol et d'ammoniac, servant à la désinfection des couveuses et des respirateurs, le rôle de l'ammoniac étant de diminuer la toxicité des vapeurs.

L'oxyde d'éthylène est utilisé dans l'industrie pour la désinfection de certains matériels en plastique à usage unique. Dans les centres hospitaliers, une enceinte est réservée à ce type de

désinfection pour le matériel d'intubation par exemple, qui ne supporte pas l'échauffement. Ce matériel, acheté stérile passe une seule fois dans l'enceinte à oxyde d'éthylène, pour une deuxième utilisation, puis il est détruit.

En conclusion, on peut noter que les types de stérilisation sont nombreux et que, quel que soit le matériel à traiter, il existe actuellement une méthode adaptée. A notre niveau, dans un laboratoire ou une salle de classe dans laquelle les élèves manipulent des souches bactériennes, il est indispensable de respecter les règles fondamentales de l'asepsie :

- **Port d'une blouse en coton, fermée.**
- **Travail dans la zone de stérilité du bec Bunsen.**
- **Flambage rapide des orifices des tubes à cultures et du matériel de prélèvement et d'ensemencement.**
- **Immersion de toutes les lames et petit matériel dans l'eau de Javel.**
- **Nettoyage rigoureux des mains avant et après la séance.**
- **Nettoyage des paillasses et du matériel éventuellement contaminé.**
- **Lavage à ébullition des blouses contaminées.**
- **Au niveau du laboratoire, les boîtes de Pétri et tubes de culture usagés seront entièrement immergés dans de l'eau de Javel pendant 24 h. Les boîtes en plastique seront ensuite incinérées.**
- **La verrerie et tout le matériel supportant la chaleur seront soigneusement lavés puis stérilisés dans une étuve à chaleur sèche (180°C pendant 30 à 45 minutes) ou un autoclave (120°C pendant 20 à 30 minutes).**