un récipient protégé, d'autre part, contre les poussières atmosphériques par une bourre de coton (*b*) : il brisait la pointe à l'intérieur de l'organe; en produisant une aspiration du côté de la bourre, il provoquait la pénétration du liquide dans le récipient et, quand il en avait une quantité suffisante, il fermait rapidement la pointe brisée, à l'aide de la lampe d'émailleur. Le liquide ainsi recueilli pouvait séjourner indéfiniment dans le ballon sans se corrompre; extrait du ballon, il ne manifestait au microscope la présence d'aucun être vivant. Ainsi tombait la dernière objection qui pouvait être faite à la théorie du panspermisme, qu'on peut, en résumé, énoncer sous la forme suivante :

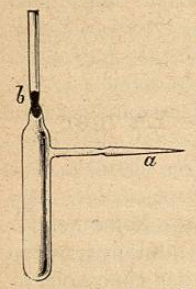

Fig. 111. — Appareil pour recueillir aseptiquement les liquides organiques.

Dans tous les cas où on croyait avoir observé la génération spontanée de quelque être vivant, il a été possible de montrer par quelle voie le germe de cet être vivant avait pu être introduit dans le milieu où il s'était développé.

Toutes les fois qu'on fait parvenir dans un milieu favorable des germes vivants d'êtres organisés, ces germes évoluent et donnent naissance à des êtres vivants.

Résumons-nous encore : *tout être vivant, quelque simple qu'il soit, doit être considéré, dans la nature actuelle, comme provenant d'un être vivant de même espèce, qui a existé avant lui.*

DIXIÈME LEÇON

La technique bactériologique. — La morphologie des Bactéries.

Extrême diffusion des Bactéries. — Notre dernière leçon nous a appris, à n'en pas douter, qu'il n'y a pas d'êtres vivants, aussi simples qu'on veuille les concevoir, qui ne proviennent du développement de germes formés par des organismes préexistants. Les Bactéries ne font pas exception à cette règle. Leurs germes, prêts à poursuivre plus tard leur évolution, sont répartis dans l'air qui nous entoure, sur le sol et les corps divers qui le recouvrent, dans l'eau qui coule ou séjourne à sa surface, dans l'intérieur du sol lui-même. Le milieu où ils se trouvent portés convient-il à leur développement, aussitôt ils passent de la vie très ralentie, qui caractérise leur état de repos, à une vie plus active : ils germent, et bientôt pullule l'espèce qu'ils avaient mission de conserver.

La technique bactériologique. — Il convient maintenant de nous demander comment on doit procéder pour faire l'étude méthodique d'une espèce déterminée de Bactéries.

Recherche des Bactéries. — La première chose à faire est de reconnaître l'existence des Bactéries dans le milieu soupçonné d'en contenir et qui doit nous fournir des éléments d'étude; ainsi se pose tout d'abord devant nous le problème de la *recherche des Bactéries*.

Supposons, pour fixer les idées, qu'il s'agisse de mettre en évidence l'existence de Bactéries dans une de ces taches de couleur pourpre qui se développent rapidement, dans un lieu humide et chaud, à la surface de la colle de pâte ou des

tranches de pain. On prend, avec l'extrémité d'une aiguille, un peu de la matière pâteuse qui offre cette coloration rouge et on l'étale en couche mince à la surface d'une lamelle couvre-objet. Pour être plus certain d'obtenir une couche uniformément mince, on peut intercaler la matière pâteuse entre deux lamelles qu'on fait glisser l'une sur l'autre entre le pouce et l'index, en tournant légèrement les deux doigts dans le même sens : on obtient ainsi à la fois deux lamelles chargées de la matière suspecte. On laisse sécher la surface contaminée de la lamelle, condition qui se trouve réalisée au bout de quelques minutes; puis, pour coaguler les substances albuminoïdes et les mucilages que peut renfermer la préparation, on passe rapidement, deux ou trois fois de suite, la lamelle, tenue à l'extrémité d'une pince, au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool, en ayant soin de tourner en haut la face chargée de Bactéries. On met dans un verre de montre un peu du réactif colorant qu'on désire employer, par exemple de la fuchsine, du violet de gentiane, du bleu de méthylène. On a toujours en réserve des solutions alcooliques concentrées de ces réactifs; on verse, au moment de s'en servir, goutte à goutte, un peu de la solution concentrée dans de l'eau distillée. Sur le réactif colorant ainsi préparé et contenu dans le verre de montre, on dépose avec précautions la lamelle traitée comme il vient d'être dit, de manière qu'elle flotte, la face chargée de Bactéries en contact avec le réactif colorant. On laisse séjourner la lamelle de dix à trente minutes, suivant la nature de la préparation et celle du réactif colorant. Parfois on peut accélérer la coloration en chauffant le réactif à une température qui varie entre 30 et 60 degrés : on emploie généralement pour cela une sorte de ruban métallique recourbé en S, qu'on chauffe à l'une de ses extrémités tandis qu'on dépose le verre de montre à l'extrémité opposée; la conductibilité du métal transmet la chaleur jusqu'au verre de montre. Ceci fait, on décolore la préparation par un lavage à l'eau distillée : les Bactéries seules conservent la matière colorante. On sèche la préparation en l'exposant à l'air ou, si l'on veut obtenir un séchage plus

rapide, en la comprimant entre deux feuilles de papier buvard. Pour l'examiner au microscope, on verse une goutte de térébenthine ou de xylol, ou encore d'huile de cèdre, sur une lame porte-objet; on dépose à la surface de cette goutte la lamelle préparée, en mettant la face chargée de Bactéries en contact avec la goutte : écrasée par la lamelle, la goutte s'étale et devient infiniment mince; la préparation peut alors être examinée par transparence.

Cultures pures. — En examinant une préparation ainsi obtenue, on peut n'observer aucune forme de Bactéries; à moins de supposer que la préparation ait été défectueuse ou que les moyens d'observation soient insuffisants[1], on doit alors admettre que le milieu suspect est dépourvu de Bactéries. La préparation peut, au contraire, renfermer un grand nombre de Bactéries, de forme identique, appartenant par suite à une espèce unique. Enfin il arrive souvent qu'elle contienne plusieurs formes de Bactéries, parmi lesquelles une peut dominer. Il s'agit alors de séparer cette forme dominante de toutes celles qui s'y trouvent mélangées; pour *isoler* l'espèce à laquelle appartient cette forme, il est nécessaire d'en obtenir une *culture pure*.

Milieux de culture.— Il faut d'abord faire choix d'un *milieu de culture*. Ce milieu doit renfermer les substances qui paraissent *à priori* le plus aptes au développement de l'espèce étudiée; il doit rappeler, en d'autres termes, autant que possible, le milieu naturel sur lequel cette espèce a été observée. Remarquons, d'ailleurs, que, d'une manière générale, tous les milieux favorables au développement des Bactéries ont une réaction alcaline. En même temps que le milieu de culture doit être favorable au développement de l'espèce qu'on étudie, il faut aussi que ce milieu se prête facilement à l'observation de ce développement.

Les milieux qu'on emploie, en tenant compte de ces données générales, peuvent être liquides ou solides.

---

1. Il est souvent indispensable d'employer, pour l'examen microscopique des Bactéries, les *objectifs à immersion*.

Parmi les milieux liquides qu'on utilise le plus fréquemment, il faut citer les *bouillons* de viande, le bouillon de bœuf par exemple. Le bouillon qu'on prépare pour une culture de Bactéries doit être légèrement salé : il faut qu'il renferme environ 5 grammes de sel par litre. Il doit aussi être riche en substances azotées : on assure la réalisation de cette condition en y ajoutant environ 10 grammes de peptone par litre. Il doit encore être parfaitement dégraissé : on emploie, pour le préparer, de la viande minutieusement débarrassée de ses particules grasses et hachée en menus morceaux; de plus, après avoir salé et peptonisé le bouillon, on le filtre à chaud sur du papier mouillé, qui arrête les derniers globules de graisse. Enfin la réaction du bouillon doit être alcaline : on y ajoute avec précaution un peu d'une solution concentrée de carbonate de soude jusqu'au moment où un papier rouge de tournesol, trempé dans le bouillon, vire nettement au bleu.

On conçoit qu'on puisse varier à l'infini la composition du bouillon de culture en y introduisant telle ou telle substance qu'on suppose favorable au développement de la Bactérie étudiée ou dont on veut déterminer l'action sur ce développement.

Comme milieux solides de culture, on peut citer, parmi les plus usités, des fragments de pommes de terre ou de carottes cuites dans la vapeur d'eau. Mais on comprend aisément que de semblables milieux offrent cet inconvénient d'avoir une composition absolument fixe, que l'expérimentateur ne peut pas modifier à son gré; ces milieux sont, de plus, opaques, ce qui, dans certains cas, rend difficile l'observation des organismes qui s'y développent.

C'est pour obvier à ce double inconvénient que Koch a eu l'idée d'incorporer aux bouillons liquides destinés à la culture une substance fusible sous l'influence de la chaleur, solide à la température ordinaire et transparente sous ces deux formes, la *gélatine*. Il a ainsi obtenu des *gélatines nutritives*, ou, si l'on préfère ce terme, des *bouillons gélatinisés*, constituant des milieux solides, assez transparents pour permettre l'observation et dont la composition chimique pouvait être variée à l'infini. Pour obtenir un tel milieu de culture, on commence par préparer le bouillon dont on a fait choix; puis, avant de l'alcaliniser, on pèse environ 10 p. 100 de son poids de bonne gélatine en feuilles, qu'on découpe ensuite en menus fragments; on introduit bouillon et gélatine dans un matras et on chauffe le mélange au bain-marie à une température inférieure à 60 degrés, pour éviter des coagulations de matières albuminoïdes; une fois la gélatine fondue, on alcalinise le milieu par l'addition de carbonate de soude, on fait bouillir une heure à feu doux, enfin on filtre le mélange à chaud; par refroidissement, il se solidifie.

Les milieux à la gélatine ont un inconvénient : cette substance fond à une température relativement basse, de sorte qu'il est impossible d'étudier, dans de semblables milieux, le développement d'une Bactérie au-dessus d'une température voisine de 20 degrés. C'est pour éviter cet écueil qu'on substitue souvent à la gélatine une substance assez analogue, connue sous le nom d'*agar-agar* ou *gélose*, sorte de gélatine qu'on extrait du thalle de certaines Algues du groupe des Floridées (*Chondrus*, *Gigartina*, etc.); la gélose a l'avantage de rester solide aux plus hautes températures; on la mélange dans la proportion de 1 à 2 p. 100 au bouillon qu'on désire solidifier.

On emploie encore, comme milieu solide de culture, le *sérum coagulé* : on sait, en effet, que la partie liquide du sang, dépouillée de sa fibrine, forme un liquide transparent, à peine teinté de jaune, qui, sous l'action de la chaleur, se prend en masse, se coagule en un mot.

Vases à cultures. — Après avoir fait choix d'un milieu pour la culture, il faut arrêter la forme du vase dans lequel on obtiendra celle-ci. Cette forme dépend de la nature du milieu. Quand on emploie un milieu liquide, on fait généralement usage de petits matras construits spécialement pour cet usage et connus sous le nom de *matras Chamberland* (*fig.* 112). Le matras Chamberland est une

sorte de petit ballon à fond plat dont le col est extérieurement rodé à l'émeri; sur ce col peut s'engager à frottement un bouchon creux dont la face interne est aussi rodée à l'émeri; la partie supérieure du bouchon se rétrécit et se termine par un tube dans lequel on introduit un tampon d'ouate roussie destiné à arrêter les germes apportés par l'air. Le bouillon de culture remplit la moitié ou les deux tiers environ du ballon.

Fig. 112. — Matras Chamberland.

Quand on emploie un milieu solide à la gélatine ou à l'agar-agar, on fait usage de simples tubes à essai dans lesquels on verse, à l'aide d'un entonnoir, le mélange encore chaud et liquide; on remplit incomplètement le tube à essai; on le ferme avec un tampon d'ouate destiné à arrêter les germes; puis on laisse le milieu de culture se solidifier par refroidissement : si on maintient le tube vertical pendant le refroidissement, la surface libre du milieu solide est peu considérable et de forme circulaire; si on maintient le tube oblique, la surface libre du milieu solidifié est beaucoup plus étendue et possède une forme elliptique (*fig.* 113).

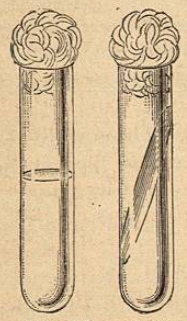

Fig. 113. — Tubes à cultures sur gélatine.

Quand la culture doit être faite sur un fragment de pomme de terre ou de carotte cuite, on emploie un tube à essai dont la forme spéciale a été imaginée par M. Roux : ce tube est étranglé vers sa partie inférieure, de manière à se terminer par une sorte de petite ampoule. On découpe dans la pomme de terre ou la carotte une sorte de parallélépipède imparfait, plus large à une de ses extrémités qu'à l'autre et taillé de telle sorte qu'il puisse entrer dans le tube, mais s'arrête au col inférieur. On lave avec soin ce bloc, on

l'introduit dans le tube, et on ferme celui-ci avec un tampon d'ouate (*fig.* 114).

Stérilisation des vases. — Rappelons-nous l'extrême diffusion des germes de Bactéries, soit dans l'air qui nous entoure, soit à la surface des objets qui s'y trouvent plongés, et nous comprendrons aisément qu'il soit nécessaire, avant de chercher à établir une culture pure dans un des vases qui viennent d'être décrits, de tuer toutes les cellules végétatives et toutes les spores de Bactéries que sa surface interne peut recéler : il faut, en un mot, *stériliser* le vase qui doit servir à la culture. Il suffit, pour cela, de le porter à une très haute température. L'appareil qu'on emploie le plus fréquemment à cet usage est connu sous le nom de *four Pasteur*. C'est une sorte de cylindre en tôle dans lequel peut être suspendu un panier en fil de fer qui contient les objets à stériliser. Ce cylindre est fermé par un couvercle percé d'une ouverture; dans celle-ci on peut engager un bouchon qui porte un thermomètre, permettant de se rendre compte de la température intérieure. On dispose sous ce cylindre une grille à gaz qui sert à le chauffer; les produits de la combustion circulent dans une sorte de manchon métallique qui entoure le cylindre et s'échappent par un tuyau latéral. On a reconnu qu'il suffit de laisser séjourner les objets de verrerie dans le cylindre pendant dix minutes, à sec et à une température de 180° pour tuer toutes les cellules et toutes les spores de Bactéries qu'ils peuvent renfermer.

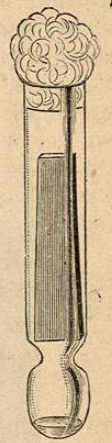

Fig. 114. Tube à culture sur pomme de terre.

Les vases, avant d'être introduits dans le four Pasteur, sont fermés à l'aide de bourres de coton : en même temps que le verre, le coton est stérilisé et roussi par la chaleur. Ainsi préparés, les vases peuvent être conservés indéfiniment, à condition qu'on ne les débouche pas : ils sont toujours prêts à servir pour des cultures pures.

Stérilisation des milieux. — Supposons qu'on veuille faire une semblable culture. On prend un vase stérilisé; on le débouche au moment précis où on va y introduire le milieu de culture (bouillon, gélatine, gélose, sérum, pomme de terre, etc.); on le charge et on le referme aussitôt en replaçant le bouchon d'ouate.

Il s'agit maintenant de stériliser le contenu.

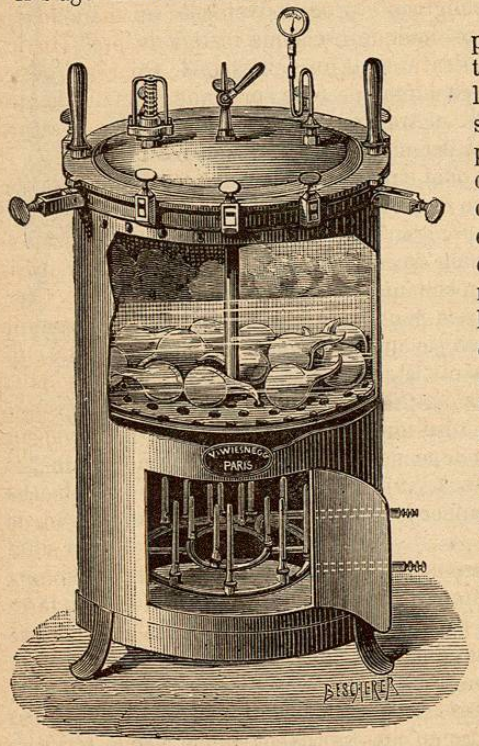

Fig. 115. — Autoclave Chamberland.

On utilise pour cela l'action de la chaleur humide, sensiblement plus énergique que celle de la chaleur sèche, et on emploie à cet effet l'appareil connu sous le nom d'*autoclave Chamberland* (*fig.* 115). C'est une sorte de marmite de Papin, à double fond, à l'intérieur de laquelle on peut déposer, sur un fond mobile percé de trous, un panier en fil de fer qui renferme, côte à côte, les objets à stériliser. On verse dans la marmite une quantité d'eau suffisante pour qu'elle affleure au niveau du fond mobile; puis on place le panier

chargé sur celui-ci; on met en place le couvercle de la marmite et on allume le gaz que fournit une grille placée au-dessous de l'autoclave. L'eau entre bientôt en ébullition, ce qu'on reconnaît au dégagement de la vapeur, qui s'échappe entre la marmite et son couvercle; on serre alors une série d'écrous qui permettent de rendre la fermeture hermétique. L'ébullition continue à l'intérieur de la marmite et la tension de la vapeur y augmente progressivement : un manomètre, fixé au couvercle, indique à chaque instant la pression interne et la température qui lui correspond. On règle généralement l'arrivée du gaz de telle sorte que l'aiguille du manomètre s'arrête au trait qui correspond à une température de 115° et à une pression d'une atmosphère et demie.

Ceci posé, on peut employer deux procédés de stérilisation avec l'autoclave.

On peut obtenir, en une seule séance, une stérilisation complète du milieu de culture : il suffit, pour cela, de maintenir l'appareil pendant trois quarts d'heure à 115°. C'est ainsi qu'on procède pour stériliser les fragments de pomme de terre ou de carotte qui servent de milieux solides de culture : ces fragments étaient crus quand on les a introduits dans les tubes de cultures; ils sont cuits en même temps que stérilisés; l'eau résultant de la condensation de la vapeur se rassemble au fond de l'ampoule qui termine le tube, et on comprend par là l'utilité de l'étranglement, qui empêche cette eau de mouiller le fragment de pomme de terre ou de carotte.

Certains milieux solides de culture, comme les milieux à la gélatine, souffrent de ce procédé : une élévation trop forte de température peut enlever à la gélatine la faculté de se coaguler ultérieurement, ce qui est évidemment contraire à son mode d'emploi. D'ailleurs, il y a des espèces de Bactéries dont les spores résistent à des températures fort élevées, et on peut craindre qu'elles survivent même à une stérilisation de trois quarts d'heure à 115°, sous une pression d'une atmosphère et demie. C'est pour éviter ces multiples inconvénients que Tyndall a imaginé le procédé de la *stérilisation*

fractionnée. Trois fois de suite, par exemple, à vingt-quatre heures d'intervalle, on chauffe pendant dix minutes, dans la vapeur d'eau à 100° d'un autoclave imparfaitement fermé, la gélatine qu'on se propose de stériliser. Chacune de ces opérations ne tue que les cellules végétatives de Bactéries contenues dans la gélatine; elle laisse intactes les spores; mais si l'on a eu soin de placer la gélatine, pendant l'intervalle de deux stérilisations consécutives, dans une étuve dont la température soit favorable à la germination des spores, un certain nombre d'entre elles ont eu le temps de germer et les cellules végétatives qu'elles ont formées sont tuées par la nouvelle stérilisation. Quand on a renouvelé cette opération un nombre suffisant de fois, on peut s'assurer que la stérilisation est complète. Par ce moyen, on tend, en quelque sorte, un piège aux spores, qu'on tue par surprise : ayant échappé à une première stérilisation, elles profitent de conditions favorables pour se développer; mais leur développement même assure leur perte, car les cellules végétatives résistent beaucoup moins à la chaleur que les spores qui les ont formées.

La méthode de Tyndall s'impose quand on veut stériliser un sérum destiné à la coagulation. C'est, en effet, entre 68° et 70° que le sérum commence à se solidifier. Il est donc impossible de le stériliser sans le coaguler si on cherche à obtenir la stérilisation du premier coup, par une forte élévation de température. Il est même nécessaire, dans ce cas, de multiplier les précautions et d'apporter de nouvelles modifications au procédé général de la stérilisation fractionnée. Huit fois de suite, à un jour d'intervalle, on chauffe le sérum, pendant une heure environ, à une température qui ne dépasse pas 58° ou 60°; après quoi on peut considérer la stérilisation comme parfaite. On obtient alors la coagulation du sérum en le maintenant, pendant un temps qui varie entre une heure et six heures, à une température comprise entre 68° et 70°; en n'élevant pas plus la température, on est sûr de conserver au sérum toute sa limpidité.

La stérilisation d'un liquide peut être aussi obtenue par

d'autres procédés que par l'action de la chaleur. Imaginons que le grain d'une substance poreuse soit assez fin pour arrêter, dans les liquides qui la traversent, toutes les cellules ou les spores de Bactéries : cette substance constituera un filtre capable de stériliser les liquides. On a essayé, dans ce but, un certain nombre de substances. Celle à laquelle s'est arrêté M. Chamberland est la porcelaine dégourdie, qui paraît capable d'arrêter tous les germes connus : une eau chargée de Bactéries coule absolument dépourvue d'organismes, après avoir filtré au travers d'une plaque formée de cette substance. Pour en rendre l'usage pratique, M. Chamberland a donné au filtre de porcelaine la forme d'une bougie (*fig.* 116) : c'est une sorte de tube cylindrique (A) en porcelaine dégourdie, fermé à l'une de ses extrémités et se terminant, à l'autre, par un goulot (B); le liquide qui doit être filtré est amené à l'extérieur de la bougie, en E, autant que possible sous pression. Il traverse les pores de la porcelaine, dépose au passage les germes qu'il contenait, et s'écoule absolument limpide par le goulot.

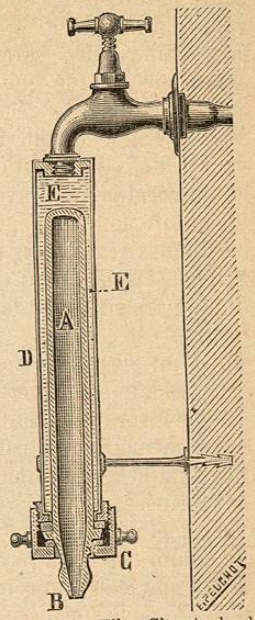

Fig. 116. — Filtre Chamberland à une seule bougie (coupe longitudinale). — A, bougie en porcelaine dégourdie; B, son goulot; D, cylindre métallique creux entourant la bougie et vissé sur le robinet; E, espace creux séparant la bougie du cylindre et rempli d'eau; C, armature métallique permettant de fixer la bougie dans le cylindre.

Semis. — Le milieu de culture une fois préparé, puis introduit dans un vase stérilisé, enfin stérilisé à son tour, il reste à y déposer le germe de la culture qu'on veut y développer : c'est ce qu'on appelle *faire un semis*. On emploie, pour cet usage, un fil de platine solidement emmanché dans

une baguette de verre et dont l'extrémité libre est souvent aplatie en forme de spatule (*fig.* 117) : le petit instrument ainsi établi est ce qu'on appelle une *aiguille à ensemencer*. Pour faire le semis, on se place, autant que possible, dans un endroit calme, à l'abri des mouvements de l'air qui pourraient avoir pour effet d'apporter des poussières et, par suite, des germes. On débouche rapidement le tube chargé du milieu de culture : si ce milieu est solide, on peut incliner le tube de manière à tourner son ouverture vers le sol, pour éviter mieux encore la pénétration des poussières de l'air. Puis on passe rapidement dans une flamme, celle d'une lampe à alcool, par exemple, l'extrémité du fil de platine jusqu'à ce qu'elle soit portée au rouge : on brûle ainsi et on détruit les germes qui pouvaient se trouver déposés à sa surface; c'est ce qu'on appelle *flamber* l'aiguille. On laisse refroidir à l'air l'extrémité flambée jusqu'à ce que sa température ne soit plus assez élevée pour tuer les germes que l'aiguille est appelée à recueillir. On touche alors, avec cette extrémité, le point qu'on sait être infesté par les Bactéries : l'aiguille est ainsi chargée de germes. On porte ensuite rapidement l'extrémité de l'aiguille dans le milieu à ensemencer. S'il s'agit d'un milieu liquide, on se contente de l'y plonger et de l'agiter quelques instants. S'il s'agit d'un milieu à la gélatine, à la gélose ou au sérum coagulé, on peut procéder de diverses façons : tantôt on pique l'aiguille dans la masse solide perpendiculairement à sa surface; tantôt on trace sur cette surface un ou plusieurs traits avec l'extrémité de l'aiguille. Le semis est fait. On bouche rapidement le vase ensemencé, dont on flambe, pour plus de sûreté, l'ouverture en la passant deux ou trois fois dans une flamme : on tue ainsi les germes, étrangers au semis, qui ont pu s'y déposer pendant l'opération.

Fig. 117. Aiguille à semis.

Développement de la culture. — Après avoir ainsi procédé au semis, on place le vase ensemencé dans une étuve

dont la température peut être maintenue indéfiniment constante, et bientôt on assiste au développement des Bactéries dont les germes ont été déposés par le semis. Si le milieu est liquide, si c'est un bouillon, par exemple, un trouble ne tarde pas à s'y manifester. Si le milieu est solide, si c'est de la gélatine nutritive, par exemple, on voit se former à sa surface ou dans sa profondeur des taches qui s'étendent de proche en proche et dont l'aspect varie suivant l'espèce de Bactéries qui les forme : chacune de ces taches constitue ce qu'on appelle une *colonie*.

Séparation des espèces. — On voit ainsi se manifester un des avantages que présentent les milieux solides de culture. Les germes que l'aiguille à semis a pris dans le milieu contaminé, au moment où on l'a chargée, peuvent être nombreux et divers. Dans un milieu liquide, ils se trouvent assez uniformément mélangés et peuvent se développer simultanément en tous les points, de telle sorte qu'il est assez difficile de les isoler. Si, au contraire, le semis a été fait sur ou dans un milieu solide, chaque germe occupe sur ou dans ce milieu une position déterminée : c'est autour de lui que se développe et s'étend la colonie qui provient de sa germination; il y a donc plus de chances pour que les diverses espèces de Bactéries qui ont été introduites par le semis se séparent les unes des autres.

Mais il faut bien dire que cette *séparation des espèces* ne se produit pas toujours du premier coup et c'est ici qu'apparaît la supériorité des milieux à la gélatine, liquéfiables à des températures relativement basses, sur les milieux dont la liquéfaction ne s'accomplit qu'à température élevée, comme les milieux à l'agar-agar. Avant de faire dans la gélatine le semis des diverses espèces de Bactéries que renferme un milieu suspect, on commence par fondre la gélatine à une température douce (30° par exemple), très éloignée de celle qui pourrait tuer les Bactéries ou leurs germes. On plonge l'aiguille chargée dans le milieu encore liquide et on l'agite rapidement de manière à disséminer les germes dans toute la masse. Si la quantité recueillie à l'extrémité de l'aiguille

était très faible, il y a quelques chances pour que les germes se trouvent isolés, par cette dispersion, à l'intérieur du milieu nutritif et pour que les espèces soient séparées du premier coup. Si cette première opération n'est pas suffisante et que le semis initial fournisse des mélanges d'espèces différentes, on peut, en prenant dans une des cultures ainsi obtenues la matière d'un nouveau semis, tenter une seconde séparation, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'on obtienne des colonies nettement distinctes. Ces colonies peuvent alors fournir des semis qui donnent des cultures absolument pures.

Résumé. — Ainsi, pour nous résumer, voici quelle est la série des opérations auxquelles le bactériologiste peut être obligé de se livrer pour obtenir une culture pure : reconnaître l'existence des Bactéries dans le terrain qu'il suppose naturellement infecté; — préparer un milieu de culture favorable au développement de ces Bactéries; — introduire ce milieu dans le vase où la culture devra se faire, puis stériliser contenant et contenu; — faire, dans ce milieu de culture, un semis à l'aide de quelques germes empruntés au terrain contaminé; — placer le milieu ensemencé dans des conditions aussi favorables que possible au développement des germes; — obtenir, si cela est nécessaire, la séparation des espèces de Bactéries qui s'y sont développées.

Applications de la technique bactériologique. — L'importance des méthodes de culture que nous venons d'exposer, bien sommairement, n'échappera à personne. Ce n'est pas, en effet, au seul groupe des Bactéries qu'il est possible et nécessaire de les appliquer. Toutes les fois qu'on voudra suivre avec certitude le développement total d'un organisme inférieur, sans craindre qu'une observation défectueuse fasse attribuer à cette espèce des formes qui lui seront tout à fait étrangères et proviendront du développement simultané d'espèces différentes, il faudra recourir à la méthode des cultures pures, des cultures Pasteur, comme on les appelle aussi pour reporter l'honneur des résultats que cette méthode a fournis sur l'illustre savant qui, le premier, en a saisi toute l'importance et en a formulé les lois.

On peut, en particulier, appliquer la méthode des cultures pures à l'étude de l'évolution des Champignons. C'est ce qu'ont fait en France, dès 1873, MM. Van Tieghem et Le Monnier, en Allemagne M. Brefeld, et, après eux, de nombreux expérimentateurs. Mais nous devons remarquer, en passant, que, si les milieux de culture que recherchent les Bactéries sont des milieux alcalins, les Champignons paraissent préférer, au contraire, les milieux acides.

Morphologie des Bactéries. — Maintenant que nous connaissons à la fois l'origine des Bactéries qui pullulent autour de nous et les procédés qu'il convient d'employer pour en faire une étude rationnelle, nous devons passer rapidement en revue quelques-uns des résultats auxquels cette étude a conduit.

Est-il possible de définir rigoureusement la forme de la cellule dans chaque espèce du groupe des Bactéries, et peut-on de cette étude purement morphologique tirer une classification de ce groupe?

La première tentative qui ait été faite dans ce sens est due à un botaniste allemand, Cohn; la classification qu'il a proposée a dû subir, par la suite, de nombreuses modifications.

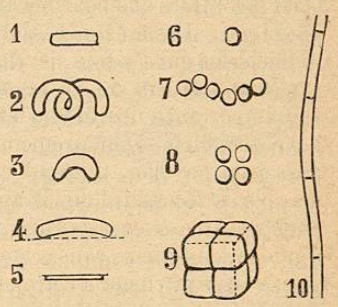

Fig. 118. — Diverses formes de Bactéries. — 1, *Bacillus*; 2, *Spirillum*; 3, *Microspira*; 4, *Vibrio*; 5, *Bacterium*; 6, *Micrococcus*; 7, *Streptococcus*; 8, *Merista*; 9, *Sarcina*; 10, *Leptothrix*.

Chez certaines espèces de Bactéries, la cellule végétative a la forme d'un bâton cylindrique, à peu près deux ou trois fois plus long que large : on rattache ces espèces au genre *Bacillus* (*fig.* 118, 1). Chez d'autres, le bâton est enroulé sur lui-même de manière à décrire un ou plusieurs tours de spire : elles appartiennent au genre *Spirillum* (2). Dans ces deux genres, la cellule végétative peut,

d'ailleurs, être cloisonnée transversalement. Dans le genre *Microspira* (3), la cellule a la forme d'un bâtonnet arqué de manière à offrir quelque ressemblance avec une virgule. Dans le genre *Vibrio* (4), c'est encore un arc, mais à courbure beaucoup plus faible et qui semble animé d'un mouvement de vibration autour de sa corde. Le genre *Bacterium* (5) se distingue de tous les précédents par la forme plus grêle de ses bâtonnets. — *Bacillus*, *Spirillum*, *Microspira*, *Vibrio*, *Bacterium* présentent ce caractère commun qu'ils sont susceptibles, dans des conditions déterminées, de former des spores endogènes ; leurs cellules végétatives se ressemblent d'ailleurs par leur forme générale, qui est toujours celle d'un cylindre plus ou moins rectiligne. A ce double titre, ces genres méritent d'être réunis dans un premier groupe.

Chez les Microcoques (*Micrococcus*), la cellule végétative a une forme arrondie et à peu près sphérique (6) : c'est à ce genre qu'appartient, sous le nom de *Micrococcus prodigiosus*, l'espèce qui produit à la surface de la colle de pâte ces taches pourpres dont nous avons eu l'occasion de parler. Chez les Streptocoques (*Streptococcus*), les cellules, encore sphériques, restent unies en files longitudinales qui forment des sortes de chapelets (7). Chez les Méristes (*Merista*), une cellule initiale, de forme sphérique, se cloisonne successivement dans deux directions perpendiculaires, de manière à former, dans un plan, quatre cellules disposées aux sommets d'un carré (8). Dans le genre Sarcine (*Sarcina*), le cloisonnement de la cellule initiale se produit successivement suivant trois directions rectangulaires et donne lieu à huit cellules, qui occupent les sommets d'un cube (9) : une espèce de ce genre (*Sarcina ventriculi*) se trouve communément à l'intérieur de l'estomac humain. — *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Merista*, *Sarcina* ont ce caractère commun de posséder des cellules sphériques, isolées ou groupées de diverses façons ; leurs spores sont inconnues ; ces deux caractères, l'un positif, l'autre négatif, permettent de les réunir dans un second groupe.

Les Leptothriches (*Leptothrix*), les Bégiates (*Beggiatoa*) ont des cellules cylindriques, associées en files longitudinales (10). Chez les Leptothriches, les filaments ainsi formés sont rectilignes et dépourvus de motilité ; chez les Bégiates, les filaments sont ondulés et capables d'un mouvement de rotation autour de leur axe. Une espèce de Leptothriche (*Leptothrix buccalis*) habite la cavité buccale de l'Homme et paraît jouer un certain rôle dans la production de la carie dentaire. Les Bégiates se rencontrent fréquemment dans les eaux sulfureuses : elles sont souvent connues sous le nom de *Sulfuraires*.

Variabilité de la forme chez les Bactéries. — L'étude purement morphologique des Bactéries ne fournit que des notions incertaines sur la valeur spécifique de leurs formes. La variété de ces formes est, en effet, infinie, et entre deux formes, qui nous paraissent au premier abord très différentes, il est aisé de trouver un grand nombre d'intermédiaires qui conduisent de l'une à l'autre par gradations insensibles. D'autre part, en variant expérimentalement les conditions dans lesquelles se développe une forme donnée, il n'est pas rare de la voir se modifier assez sensiblement pour devenir au premier abord méconnaissable. La figure 119 met en évidence quelques-unes des formes les plus dissemblables que peut revêtir une espèce connue sous le nom de Bacille du pus bleu (*Bacillus pyocyaneus*), à cause de la coloration particulière qu'elle communique aux liquides purulents. Il est donc nécessaire, pour définir rigoureusement l'espèce en bactériologie, de faire appel à d'autres indications que les caractères pure-

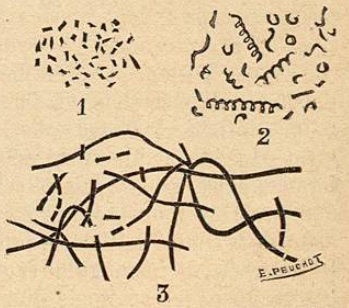

Fig. 119. — Bacille du pus bleu, cultivé dans le bouillon de bœuf : normal (1), additionné d'acide borique (2), de bichromate de potasse (3). (D'après Guignard et Charrin.)

ment morphologiques. C'est ainsi qu'on distingue certaines espèces voisines de Bactéries par la différence des actions qu'elles produisent sur la gélatine des cultures : telles espèces laissent à la gélatine sa consistance solide; d'autres la liquéfient; dans la façon dont celles-ci liquéfient la gélatine, on peut encore établir des distinctions précieuses, par exemple d'après la forme et l'aspect que présentent les régions déjà liquéfiées au milieu de la masse encore solide. C'est aussi en étudiant la physiologie des Bactéries qu'on arrive à les caractériser plus aisément. Cette étude fera l'objet de notre prochaine leçon.

ONZIÈME LEÇON

Les Bactéries (*fin*). — Fermentations et maladies.

Physiologie des Bactéries. — L'étude physiologique des Bactéries demanderait, pour être complète, des développements considérables. Nous ne pouvons songer qu'à acquérir une connaissance sommaire des principales fonctions qu'elles remplissent dans la nature.

On désigne sous le nom de Bactéries *banales* ou *inactives* les espèces très nombreuses dont le rôle paraît nul ou, du moins, n'a pas été, jusqu'à ce jour, défini d'une façon précise.

Bactéries chromogènes. — Parmi les espèces *actives*, dont le rôle est mieux connu, certaines sont *chromogènes*, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'élaborer des matières colorantes, qu'elles diffusent dans le milieu où elles se développent; de ce nombre sont *Micrococcus prodigiosus* et *Bacillus pyocyaneus*, dont nous avons déjà eu l'occasion de parler.

Bactéries ferments. — D'autres Bactéries doivent être considérées comme des *ferments*. En étudiant la Levure de bière, nous avons déjà eu l'occasion de voir un exemple de fermentation, la fermentation alcoolique, que d'autres plantes, comme les *Mucor*, sont capables aussi de réaliser dans certaines circonstances. Les phénomènes de fermentation, qui sont exceptionnels et, en quelque sorte, anormaux chez les Champignons, répondent au contraire, chez beaucoup de Bactéries, aux conditions normales de leur existence. Le nombre des fermentations aujourd'hui connues est très considérable; nous nous bornerons à l'étude d'un type très commun et très simple.

Si on expose à l'air, dans un vase largement ouvert, une boisson alcoolique, telle que du vin, du cidre, du poiré, on ne tarde pas à voir paraître à la surface du liquide une sorte de voile grisâtre, qui s'épaissit peu à peu et devient résistant, mais ne se plisse pas : au fur et à mesure que ce voile se développe et que l'espace qui lui est offert devient insuffisant, il peut s'étendre et en quelque sorte grimper le long des parois du vase. Si on soutire alors une partie du liquide contenu sous le voile, on reconnaît que son goût a été complètement modifié : il est devenu acide; le vin a été remplacé par du vinaigre, l'alcool par de l'acide acétique. C'est le phénomène de la *fermentation acétique*. S'étant passé au contact de l'air, il peut être assimilé à une *oxydation* que représente la formule suivante :

$$\underset{\text{Alcool.}}{C^2H^6O} + 2O = \underset{\text{Acide acétique.}}{C^2H^4O^2} + H^2O.$$

Si on prend, à l'extrémité d'une baguette de verre, un peu de la matière qui constitue le voile, on y voit pulluler des Bactéries extrêmement petites dont chacune présente ordinairement une forme arrondie à ses extrémités, étranglée vers son milieu, assez analogue, par conséquent, à celle d'un 8 (*fig.* 120). On peut reconnaître, par l'expérience, que ce sont ces Bactéries, et elles seules, qui réalisent la transformation