

CHAPITRE II

MILIEUX DE CULTURE : LEURS MODES DE PRÉPARATION, LEURS MODES DE STÉRILISATION.

La technique microbique comporte aujourd'hui :

- A. Des cultures en milieux liquides ;
- B. Des cultures sur milieux solides.

A. — MILIEUX LIQUIDES.

Les liquides de culture sont des plus variés. On a employé, on emploie encore :

- Les bouillons de viande ;
- Des liquides organiques naturels tels que lait, urine, humeur aqueuse, sérum ;
- Des préparations artificielles complexes telles que les liquides de Raulin, de Cohn, etc.

Enfin l'eau de levure, l'eau de touraillons, l'eau de malt, etc.

Aujourd'hui ces divers milieux sont loin d'avoir la même importance : quelques-uns, l'urine, par exemple, qui servit à M. Pasteur pour ses premières cultures, sont presque délaissés ; d'autres, telles les eaux de levure, de touraillons, de malt, ne répondent qu'à certaines indications bien déterminées : on peut en dire autant des liquides de Raulin, de Cohn, etc.

Les bouillons de viande et le lait sont les milieux liquides d'un usage général et qui conviennent le mieux à la plupart des circonstances. Nous traiterons à fond de leur mode de préparation ; nous dirons quelques mots seulement des autres.

Les bouillons.

Les bouillons de viande peuvent être dits *simples*, c'est-à-dire préparés sans addition d'aucune autre substance que quelques grammes de sel ; ils peuvent être *peptonisés*, c'est-à-dire additionnés de *peptone* ; ils peuvent être *peptonisés et glycinés*, et enfin *peptonisés, glycinés et glycosés*, quand on ajoute, outre la peptone, une certaine quantité de glycose et de glycérine.

La préparation du *bouillon simple* nous servira de type : il sera bien facile de montrer ensuite comment on obtient un bouillon peptonisé (ou *peptone*), un bouillon *pepto-glyciné*, un bouillon *pepto-glyco-glyciné*.

Bouillon simple.

Préparation. — On peut se servir de viande de *bœuf*, de *cheval*, d'*âne*, de *mulet*, de *veau*, de *mouton*, de *porc*, de *lapin*, de *poule*, etc.

Nous conseillons, entre toutes, les viandes de *bœuf*, de *veau* et de *poule*.

On prend 500 grammes de la viande choisie, *débarrassée* des os, de la graisse, des tendons, des aponévroses, et *hachée* finement.

On place ces 500 grammes de viande dans un récipient contenant 1000 grammes d'eau *distillée* (1).

(1) Le bouillon contenant 500 grammes de viande pour 1000 d'eau.

Avec une spatule en porcelaine on mélange soigneusement la viande à l'eau, et on laisse macérer pendant vingt-quatre heures à froid.

On peut, pour gagner du temps, remplacer la macération à froid par la *macération à chaud* : on place alors les 500 grammes de viande dans 1000 grammes d'eau distillée portée préalablement à la température de + 50° environ, et on laisse macérer dans l'autoclave pendant une demi-heure à + 50° environ; cette température ne doit pas être dépassée, car, au delà, l'albumine se coagulerait, et retiendrait une certaine quantité de matières solubles.

La macération à froid est préférable à la macération à chaud.

Après vingt-quatre heures de macération, on filtre sur un linge mouillé, et l'on obtient une certaine quantité d'un bouillon légèrement rougeâtre : on pèse alors exactement ce bouillon, et on ajoute autant de grammes d'eau distillée qu'il faut pour que le poids du bouillon atteigne le double du poids de la viande employée, soit 1000 grammes. On introduit dans le bouillon un demi p. 100 de sel marin.

Placez le bouillon ainsi préparé dans un vase émaillé — une boîte à lait émaillée remplit parfaitement le but. Portez ce vase dans l'autoclave, et élevez, suivant les règles que nous dirons ailleurs, la température à 115°. Après vingt ou trente minutes à 115° éteignez.

Ouvrez l'autoclave quand l'aiguille est revenue à 100° et retirez le récipient.

est le bouillon d'usage courant : la fraction 1/2 représente sa composition, son degré.

On peut varier à volonté ce degré et faire des bouillons à 1/3, 1/4, 1/5. C'est ainsi que M. Chauveau cultive ses vaccins charbonneux dans du bouillon de veau à 1/5.

Filtrez sur un papier-filtre épais : le papier-filtre *Chardin* est le plus convenable.

Le bouillon, résultant de ces diverses opérations, doit rougir plus ou moins le tournesol bleu ; il est *acide*, car la réaction de la viande de bonne qualité est acide, et par conséquent impropre à faire un milieu de culture : il faut le rendre alcalin.

Pour cela, on ajoute par petites quantités une solution de *carbonate de soude* jusqu'à ce que le papier de tournesol donne à l'essai une réaction *neutre* ou légèrement *alcaline*.

Portez alors le bouillon neutre ou alcalin dans l'autoclave et soumettez-le à la température de 115° pendant quinze minutes.

Filtrez sur papier *Chardin* et recevez le liquide qui filtre dans un vase ou un ballon d'un litre, vase ou ballon préalablement stérilisé. Lorsque le vase est rempli, bouchez-le avec un tampon d'ouate, et sur ce tampon d'ouate placez un capuchon de papier filtre ou de simple papier dont vous assurerez la fixité par quelques tours de fil.

Portez le récipient dans l'autoclave et stérilisez à 115° pendant un quart d'heure.

Au sortir de l'autoclave le liquide est quelquefois trouble ; un repos de vingt-quatre heures suffira pour rendre au bouillon toute sa limpidité.

Au lieu de conserver le bouillon au repos vingt-quatre heures dans une armoire, il est préférable — afin d'avoir toute sécurité — de le placer ce laps de temps à l'étuve, soumis à une température de 37° environ. Le bouillon doit garder sa limpidité parfaite pendant ce séjour. S'il se troublait il serait rejeté.

Après toutes ces opérations le bouillon est prêt et parfaitement stérile. On le conservera tel quel dans son récipient, ou on le décantera dans les pipettes Chamberland et les matrâs de culture

suivant une technique que nous dirons plus tard.

Les opérations nécessaires à la préparation du *bouillon simple* peuvent se résumer d'une façon synthétique comme suit :

1^{er} temps. — Macération à chaud ou de préférence à froid, pendant vingt-quatre heures, de 500 grammes de viande dans 1000 grammes d'eau ;

2^e temps. — Expression du jus de viande à travers un linge ;

3^e temps. — Ramener à 1000 grammes s'il y a lieu la quantité totale de liquide et ajouter sel marin (1/2 p. 100) ;

4^e temps. — Porter dans l'autoclave à 115° ;

5^e temps. — Filtrer sur papier Chardin ;

6^e temps. — Alcaliniser ou neutraliser ;

7^e temps. — Soumettre dans l'autoclave à 115° pendant quinze minutes ;

8^e temps. — Filtrer sur papier Chardin et recevoir dans un récipient stérile d'une contenance d'un litre ;

9^e temps. — Porter le récipient dans l'autoclave et stériliser à 115° pendant quinze minutes.

A dater du deuxième temps toute cette préparation qui semble si difficile et si longue ne dure pas en réalité plus d'une heure et demie à deux heures : elle est d'autre part des plus simples.

Bouillon peptonisé.

Le bouillon simple est d'un usage beaucoup moins ordinaire que le bouillon dit peptonisé, ou plus simplement *bouillon-peptone*, qui constitue le type classique du milieu de culture liquide.

La préparation du bouillon-peptone est *calquée sur celle du bouillon simple* et ne comporte que l'addition suivante :

Au 3^e temps de la préparation mettez dans le bouillon — outre 1/2 p. 100 de sel — 1 p. 100 de peptone. On recommande la peptone marque Chateaut ; toute autre peptone peut d'ailleurs être employée.

Les autres temps s'exécutent comme il est dit ci-dessus.

Bouillon peptonisé et glycosé.

Au 3^e temps de la préparation ajoutez au bouillon — outre le sel — 1 p. 100 de peptone et 1 à 2 p. 100 de glycose pure.

Tous les autres temps s'exécutent comme il est dit ci-dessus.

Bouillon peptonisé, glycosé et glycérimé (pepto-glyco-glycérimé).

Au 3^e temps de la préparation ajoutez au bouillon 1 p. 100 de peptone, 1 à 2 p. 100 de glycose.

Exécutez les 4^e, 5^e, 6^e, 7^e et 8^e temps comme il est dit ci-dessus. Mais au 8^e temps au liquide filtré ajoutez, avant de boucher à l'ouate et de placer le capuchon de papier, de 5 à 10 p. 100, suivant le cas, de glycérine *pure*.

Exécutez le 9^e temps comme il est dit.

RÉPARTITION DU BOUILLON DANS LES VASES DE CULTURE. — Le bouillon simple ou peptonisé, ou pepto-glyco-glycérimé après avoir été préparé, stérilisé, et éprouvé par le séjour dans l'étuve, doit être réparti dans les vases de culture.

Nous prendrons pour type de l'opération la répartition dans les matras Pasteur ; notre description sera facilement appliquée à tout autre récipient : tube à essai, matras cylindrique, flacon d'Erlenmeyer, etc., etc. Une règle commune est

que tout vase qui recevra le bouillon doit être d'une *stérilité* parfaite.

L'opération se fait en deux temps, de la façon suivante : le bouillon est *d'abord* aspiré du vase qui le contient dans le ballon-pipette Chamberland, et de cette pipette il est *ensuite* distribué dans les matras. Dans quelques laboratoires il est d'ailleurs d'un usage courant de répartir les bouillons, aussitôt faits, dans des pipettes Chamberland, et de les conserver de la sorte jusqu'au moment de l'usage : à cet instant seulement on les transvase de la pipette dans les matras de culture.

Voici la description de cette double opération :

Prenez une pipette Chamberland *stérile*, brisez l'extrémité de l'effilure latérale par un trait de lime, et stérilisez toute la surface extérieure de cette effilure en la passant plusieurs fois dans la lampe à alcool.

Disposez alors le récipient qui contient le bouillon devant vous, inclinez-le fortement, et assurez-le dans cette position inclinée par un moyen quelconque : il est très commode de faire usage à cet effet d'une boîte à cigares vide où le vase est facilement maintenu par les rebords de la boîte dans la position voulue.

Enlevez le tampon d'ouate de ce récipient, et stérilisez avec une flamme douce de gaz ou à la lampe à alcool le col et l'ouverture du vase.

Passez alors une fois encore l'effilure de la pipette Chamberland dans la flamme, et plongez dans le récipient à bouillon cette effilure de la pipette que vous ferez pénétrer dans le liquide, sans aller jusqu'au fond, où un dépôt s'est le plus souvent formé ; aspirez le liquide dans la pipette par le tube supérieur de celle-ci.

Il faut ne pas recueillir tout le liquide du ballon,

et notamment il faut arrêter l'opération de façon à ne pas aspirer la partie superficielle qui, pendant les manipulations, aurait pu être souillée par quelque germe atmosphérique.

Si le bouillon doit être conservé dans la pipette Chamberland il ne reste qu'à fermer l'effilure latérale de celle-ci. On procédera plus tard à la répartition dans les matras.

Cette répartition, qu'elle se fasse *immédiatement* ou *après un intervalle quelconque*, s'effectue de la façon suivante :

On prend un matras dans la main gauche, et on l'incline de façon que son grand axe soit horizontal (voy. à l'article *Technique des cultures* la position à donner au matras) : cette position soustraira l'intérieur du vase débouché aux germes de l'atmosphère. On saisit la pipette Chamberland de la main droite ; on stérilise l'effilure latérale en la passant dans la flamme ; avec le pouce et l'index de la main droite on débouche le matras ; on introduit l'extrémité de l'effilure de la pipette dans le matras ; on souffle par le tube supérieur, et on emplit ainsi le matras jusqu'au quart ou au cinquième. On retire alors l'effilure de la pipette, et on recouvre immédiatement le matras de son bouchon protecteur.

On recommence pour chaque matras à remplir cette délicate opération, qui doit être faite très rapidement, car plus on manipule vite, moins on expose les matras aux souillures atmosphériques.

Les deux conditions essentielles pour réussir sont :

1° Tenir les matras à remplir dans la position horizontale et immobiles ;

2° Soit avant de recueillir le bouillon dans la pipette, soit avant la distribution dans chacun des matras, avoir soin de parfaitement stériliser l'effi-

lure latérale de la pipette dans la flamme de gaz ou d'une lampe à alcool.

Les matras remplis seront portés à l'étuve à 37° et soumis à cette température pendant au moins quarante-huit heures avant d'être mis en usage.

Ce laps de temps écoulé on les examine et on rejette ceux dont le bouillon est troublé, ce qui indique qu'une impureté s'est introduite dans le liquide au cours des manipulations.

On ne doit conserver que les matras dans lesquels le bouillon est bien limpide et transparent.

Cette description s'applique de tous points au remplissage des vases de culture autres que les matras Pasteur : tubes à essai, matras cylindriques, flacons d'Erlenmeyer, etc. Si l'on fait usage de vases bouchés à l'ouate, on devra, quand le récipient a été rempli et le tampon d'ouate remplacé, brûler à la flamme la partie de ce tampon qui émerge hors du col du vase et passer la flamme sur la surface extérieure de ce col.

Le lait.

Il existe deux catégories de procédés pour préparer le lait, pour en faire un milieu de culture : les procédés de la première catégorie sont usuels, car ils sont de facile application, mais non exempts de toute critique; le procédé de la seconde catégorie est un procédé perfectionné, mais qui a le défaut de n'être pas à la portée de tous. Nous décrivons successivement ces deux sortes de procédés :

1. On prend une certaine quantité de bon lait, à réaction *alcaline*, que l'on introduit dans un ballon préalablement stérilisé; on porte à l'autoclave et on stérilise à + 115° pendant un quart d'heure. On laisse reposer ensuite. Par le refroidissement les parties grasses remontent à la

surface. On recueille alors dans une pipette Chamberland stérilisée, en ayant soin de ne pas prendre la graisse. Pour cela il suffit de plonger l'effilure de la pipette jusqu'au fond du liquide, et de ne plus aspirer dès qu'il ne reste plus qu'un peu de liquide au-dessous de la couche grasseuse superficielle. On distribue ensuite le lait dans des matras Pasteur ou tout autre récipient à culture.

Dans toute l'opération (aspiration du lait dans la pipette Chamberland, distribution dans les matras), on s'entoure de toutes les précautions que nous avons indiquées en traitant de la même manipulation portant sur les bouillons.

On place les matras remplis au quart ou au cinquième à l'étuve (37°). Après vingt-quatre ou quarante-huit heures on les examine; on rejette ceux dont le lait est coagulé ou couvert de moisissures.

Quant aux autres matras, il faut, avant de se servir pour la culture du lait qu'ils contiennent, examiner ce lait au microscope *comme on examinerait une culture*, de façon à s'assurer qu'il ne contient pas de microbes.

Si on veut opérer avec plus de rigueur et de sûreté, on peut, avant de se servir d'un de ces matras, *ensemencer un bouillon* avec une goutte du lait qu'il contient; on porte le bouillon à l'étuve. Si après vingt-quatre heures ce bouillon a gardé toute sa limpidité, le lait éprouvé peut être considéré comme absolument pur.

Une variante de ce procédé est la suivante : introduisez dans de petits ballons, dans des matras, des tubes à essai, etc., quelques grammes de lait. Portez ces ballons bouchés à l'ouate dans l'autoclave; élevez la température à 115° pendant un quart d'heure. Retirez de l'autoclave les petits ballons. Le lait est stérile, et prêt à servir *immédiatement*. Ce procédé rapide est tout à fait de

mise quand on ne demande au lait qu'une réaction biologique de culture. (Voy. l'article *B. coli communis*.)

Un procédé qui tient des précédents et de celui qui va suivre — car on y cherche, comme dans celui-ci, à éviter l'altération du lait par les hautes températures — consiste à remplir de lait jusqu'à hauteur convenable des matras, — toutes les formes indiquées pour les bouillons sont bonnes — ou des tubes à essai. On stérilise ensuite en procédant comme nous le dirons pour le sérum, c'est-à-dire suivant la méthode de Tyndall, en soumettant cinq à six jours de suite ces matras ou tubes à une température réglée entre 65 et 70° maintenue pendant une heure (Hueppe).

2. La haute température à laquelle on soumet le lait pour le priver de germes modifie sa composition. « Il faut pouvoir conserver ce liquide dans l'état même où il sort du pis de la vache. Il y a plusieurs procédés pour cela.

« Le plus simple de tous, et le plus facile à mettre en œuvre partout, consiste à prendre des tubes à essai » bouchés à l'ouate et stérilisés préalablement. « Pour y introduire du lait, on lave bien le pis de la vache, et quand les premiers mouvements de mulsion ont bien nettoyé les parois du canal, on enlève doucement avec une pince le bouchon de coton qui ferme le tube, et l'on dirige dans l'intérieur le liquide qui s'écoule, en ayant soin de tenir le tube tout près de la mamelle, sans pourtant la toucher. On ne peut éviter qu'une portion du lait ne coule à l'extérieur du tube; cela est sans importance, et il vaut mieux le perdre que chercher à le recueillir. On remet le bouchon qu'un aide a gardé à l'extrémité de la pince, et on reporte le tout au laboratoire.

« On doit préparer ainsi plusieurs tubes; quel-

ques-uns s'altèrent, cela est inévitable avec une manipulation aussi délicate, mais il y en a toujours un grand nombre qui restent inaltérés, si on a bien opéré. » (Duclaux, *Annales de l'Institut agronomique*, 1882, p. 24.)

On s'assurera de la pureté du lait au moment de l'emploi par les procédés indiqués ci-dessus.

Urine.

L'urine n'est plus guère employée dans la technique des cultures. On sait que c'est dans ce milieu que M. Pasteur a cultivé d'abord la bactérie charbonneuse.

Voici les indications sommaires nécessaires à sa préparation, le cas échéant :

On recueille de l'urine; on la filtre sur un papier Laurent; on l'alcalinise, et on la stérilise comme un bouillon. On la laisse reposer, puis on l'aspire du récipient qui la contient dans un ballon Chamberland d'où elle est distribuée avec les précautions d'usage dans les matras de culture.

Ces matras sont soumis à l'étuve à la température de + 37° pendant quarante-huit heures. Tout matras qui se trouble doit être rejeté.

Humeur aqueuse.

C'est en cultivant *en cellules* dans l'humeur aqueuse la bactérie charbonneuse que Koch a pu étudier l'évolution de cet organisme.

Voici comment on peut, à l'occasion, se procurer une certaine quantité d'humeur aqueuse pure :

Extirpez l'œil d'un sujet récemment sacrifié : l'espèce est indifférente. Avec une baguette de verre chauffée dans la flamme d'un bec Bunsen ou d'une lampe à alcool, cautérisez la cornée de l'œil

extirpé. Prenez une pipette Pasteur stérilisée, détachez la pointe de cette pipette, soit d'un trait de lime, soit en la brisant avec le doigt. Passez l'effilure dans la flamme et ponctionnez la cornée avec cette pipette. L'humeur aqueuse s'élève dans la cavité de la pipette; une légère pression opérée sur le globe oculaire permet d'obtenir la quantité de liquide voulue. Retirez la pipette, et fermez-en la pointe à la flamme. Vous aurez ainsi une certaine quantité d'humeur aqueuse pure que vous emploierez quand besoin en sera.

Sérum.

Nous étudierons plus loin en détail la manière de recueillir le sérum et d'en faire un milieu solide.

Mais le sérum à l'état liquide peut dans quelques cas être employé comme milieu de culture. On emploiera à cet effet le sérum une fois réparti dans les tubes à essai comme nous dirons plus loin. Nous renvoyons à l'article traitant du sérum gélatinisé pour tous les détails.

Eau de levure.

Dans 1000 grammes d'eau, mettez 100 grammes de levure; délayez lentement, de façon à faire un lait.

Portez le récipient dans l'autoclave ou au bain-marie et faites bouillir.

Après l'ébullition, assurez-vous de la réaction: elle est ordinairement acide. Alcalinisez alors légèrement avec une solution de soude.

Filtrez et recevez le liquide dans un vase stérile. Portez à l'autoclave et stérilisez à 115° pendant un quart d'heure.

Répartissez dans des matras de culture à l'aide de la pipette Chamberland et achevez en suivant de tous points la culture indiquée pour les bouillons.

Eau de malt.

Broyez le malt (orge germée) et délayez 100 grammes dans 1000 grammes d'eau. Chauffez à 55°-58° pendant une heure, sans dépasser cette température; au delà en effet la diastase serait détruite.

Portez alors à l'ébullition: filtrez, recevez dans un vase stérilisé et soumettez dans l'autoclave à 115° pendant un quart d'heure.

Achievez par aspiration dans la pipette Chamberland et répartition dans les matras de culture comme nous l'avons indiqué ci-dessus.

Eau de touraillons.

Procédez comme pour l'eau de malt.

B. — MILIEUX SOLIDES.

Ces milieux sont:

- La *gélatine* et la *géluse*, milieux transparents;
- Le *sérum gélatinisé*, milieu semi-transparent;
- Et divers milieux opaques dont le type le plus parfait est la *pomme de terre*.

Gélatine.

Le type de la gélatine de culture c'est la gélatine peptone, c'est-à-dire additionnée de peptone. Mais il y a parfois lieu d'avoir de la gélatine peptone additionnée de glycose, de glycérine, ou de glycose et glycérine.