

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 *géllose*, 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 glucose, de glycérine, ou de glucose et glycérine.

Nous décrirons donc successivement la façon de préparer la gélatine peptone, la gélatine pepto-glycosée, pepto-glycérinée et pepto-glyco-glycérinée ;

A. *Gélatine peptone.*

1° Prenez 500 grammes de bouillon peptone neutre ou légèrement alcalin préparé d'avance, stérile, et évitez de recueillir le dépôt, s'il y en a. Placez-les dans un récipient : vase émaillé, capsule en porcelaine, etc., et ajoutez 10 grammes p. 100 de gélatine, soit 50 grammes. La gélatine est livrée dans le commerce sous forme de plaques et connue sous le nom de gélatine extra-fine. Il faut, avant de l'introduire dans le bouillon, la couper en petits morceaux qu'on lave dans l'eau distillée ;

2° Chauffez dans un bain-marie à 100° et remuez constamment le mélange jusqu'à ce que la gélatine soit fondue en totalité, ce qui arrive dans un laps de temps qui ne dépasse pas dix minutes ;

3° Assurez-vous alors de la réaction du mélange. Cette réaction faite doit être neutre ou légèrement alcaline ; au cas où il n'en serait pas ainsi, ramenez avec la solution de carbonate de soude à neutralité parfaite ou légère alcalinité, et dans ce cas seulement prolongez l'ébullition de quelques minutes, dix environ ;

4° Filtrez sur papier Chardin, en ayant eu soin d'amorcer le filtre au préalable. La gélatine passe claire et très rapidement. La filtration à chaud est excellente et rend l'opération encore plus facile : le produit filtré est réparti tout aussitôt et pendant que sa haute température le maintient liquide dans des tubes à essai stériles. Cette opération se fait à l'aide d'un petit entonnoir, en ayant soin de ne pas laisser tomber de gélatine sur la partie supérieure du tube destinée à loger le tampon d'ouate : faute de cette précaution, ce tampon, après le refroidissement,

dissement, adhérerait au verre. On remplit chaque tube jusqu'au quart ou au tiers inférieur environ.

Ceci fait, on met en place les tampons d'ouate, et on les recouvre d'un capuchon en papier-filtre.

On stérilise ensuite une fois encore la gélatine en soumettant les tubes dans l'autoclave à + 105° pendant un quart d'heure (1).

On les retire ; on en place un certain nombre, destinés aux cultures en strie sur un plan incliné, on laisse les autres dans la position verticale. Par le refroidissement la gélatine fait prise et est prête pour les ensemencements.

Le procédé que nous venons de décrire consiste, on le voit, à *gélatiser* simplement un *bouillon* préparé à l'avance et réunissant les qualités requises : *limpidité, alcalinité*. Ce procédé a les avantages de la simplicité et de la rapidité ; il donne un produit toujours clair.

On peut encore employer le procédé suivant, qui donne les mêmes résultats :

Faites fondre la gélatine dans le bouillon à la température de 50°-60° pendant quarante à cinquante minutes, en remuant. Vérifiez la réaction. Portez à 100° dans l'autoclave pendant dix à quinze minutes. Filtrez à chaud sur papier Chardin et achevez comme ci-dessus.

Dans les cas exceptionnels où le produit filtré

(1) Il est de rigueur de ne pas dépasser cette température de 105° : la gélatine portée au delà courrait risque de ne plus faire prise au refroidissement. La plupart des auteurs conseillent même au lieu de cette stérilisation sous pression une stérilisation par chauffage pendant trois jours consécutifs à 100° un quart d'heure. Nous assurons n'avoir pour ainsi dire jamais eu d'échec, et avoir toujours vu la gélatine faire parfaitement prise avec la méthode que nous préconisons. Il n'est donc pas nécessaire, croyons-nous, de s'imposer les ennuis d'un chauffage trois fois répété, pour éviter un accident absolument rare.

serait légèrement trouble il est facile de clarifier par l'addition d'un blanc d'œuf.

Laissez tomber la température du milieu à 50° environ; versez-y un blanc d'œuf délayé dans 50 centimètres cubes d'eau et intimement mélangé à l'eau par un battage prolongé; élevez alors la température de la gélatine à 100°, et maintenez pendant un quart d'heure.

Filtrez sur papier Chardin, répartissez dans les tubes et achevez comme ci-dessus.

B. *Gélatine pepto-glycérinée.*

Prenez un bouillon pepto-glyco-glycériné et exécutez toutes les opérations décrites pour la préparation de la gélatine peptone.

C. *Gélatine pepto-glyco-glycérinée.*

Prenez un bouillon pepto-glyco-glycériné et faites comme il est dit ci-dessus.

Gélose.

La gélose est le produit colloïde retiré par Payen d'une algue à laquelle les Allemands ont donné le nom d'agar-agar. La gélose se trouve dans le commerce.

On prépare pour les cultures diverses sortes de gélose : gélose simple, gélose glycérinée, gélose pepto-glyco-glycérinée.

Nous décrirons successivement le mode de préparation de chacun de ces milieux :

1) *Gélose simple.*

Nous conseillons pour la préparation de la gélose simple deux procédés : le premier, d'une grande rapidité d'exécution, nous a toujours donné les meilleurs résultats.

Le deuxième est classique : il a été formulé par M. Roux.

A. 1° Faites macérer pendant vingt-quatre heures 10 à 15 grammes de gélose coupée finement dans une solution d'acide à 6 p. 100. L'acide chlorhydrique convient parfaitement.

Filtrez alors sur un linge, lavez largement à l'eau distillée la gélose qui reste sur le filtre, et lavez enfin à la solution de carbonate de soude. L'eau de lavage ne doit plus présenter trace d'acidité après ces opérations.

2° Versez dans un vase émaillé, une capsule en porcelaine, etc., 500 grammes de bouillon peptone stérile, neutre ou alcalin, préparé à l'avance, sans dépôt. Chauffez alors au bain-marie jusqu'à ébullition.

A ce moment, ajoutez au bouillon la gélose traitée comme il a été dit. Assurez-vous que la réaction du mélange est bien alcaline ou neutre, et faites le nécessaire pour déterminer cette réaction le cas échéant : la gélose bouillant en milieu acide se transformerait en sucre, ce qu'il faut absolument éviter.

Maintenez à l'ébullition en agitant constamment avec une baguette de verre ou une spatule. En moins de dix minutes la gélose est fondue et mélangée au bouillon.

3° On peut ajouter alors 10 grammes environ d'une solution aqueuse concentrée de gomme arabique. L'addition de gomme arabique a pour but d'empêcher la gélose de rouler dans les tubes à essai où elle sera versée au dernier moment; elle a seulement l'inconvénient de rendre la gélose un peu louchée.

Il est bon d'avoir toujours une solution de gomme arabique sous la main. Cette solution se prépare en faisant fondre dans l'eau au bain-

marie une certaine quantité de gomme. Le mélange doit être agité fréquemment. Quand la solution est achevée on vérifie la réaction qui doit être neutre. On alcalinise si besoin est, on met dans un vase ou un ballon stérile, on stérilise à + 115° à l'autoclave, et on recueille dans une pipette Chamberland stérile, suivant une technique que nous avons indiquée en traitant des bouillons.

La solution se conservera ainsi stérile, et prête pour l'usage.

4° Filtré sur papier Chardin, mais filtré à chaud.

La filtration à chaud est facilement réalisée avec l'appareil de Wiesnegg. L'eau est versée dans l'entonnoir creux métallique par un tube A. La rampe de gaz B allumée, et à flamme réglée convenablement, maintient le liquide contenu dans la double paroi de l'entonnoir métallique à une température voisine de l'ébullition; la température de 100° ne doit pas être atteinte, car elle donne lieu à des projections de liquide en A des plus incommodes. On pourrait d'ailleurs éviter en grande partie ces projections en garnissant A d'un bouchon traversé par un tube de verre très long. A l'intérieur de l'appareil ainsi apprêté on dispose un entonnoir en verre, contenant le papier-filtre Chardin amorcé : la gélose versée sur le papier-filtre est ainsi maintenue à une température élevée et filtre d'autant plus vite.

5° Recueillez la gélose qui passe dans les tubes à essai stériles, tubes qui seront traités comme il a été dit pour les tubes dans lesquels on recueille la gélatine : même précaution pour ne pas laisser tomber une goutte de gélose à l'orifice du tube, même disposition d'un capuchon de papier, etc.

6° Stérilisez enfin à 115° à l'autoclave pendant quinze minutes.

Les tubes seront laissés, pour la solidification, soit dans la position verticale, soit plutôt *dans la position inclinée*, la gélose se prêtant mieux, ainsi que nous le dirons plus tard (chap. v) aux cultures en surface, en strie.

La méthode que nous venons de décrire est bien simple : elle est l'analogue de celle que nous avons indiquée pour la gélatine. Elle consiste à *gélouser*, si on peut ainsi dire, un bouillon préparé d'avance et réunissant les qualités requises de limpidité, de neutralité ou d'alcalinité.

La préparation se fait vite, la filtration est satisfaisante (1), et le produit obtenu sans grande difficulté est clair. Il ne faut pas d'ailleurs exiger une transparence comparable à celle de la gélatine : la gélose la plus parfaite donne un léger *louché* au refroidissement.

Si le produit était trouble et contenait des flocons albumineux, une clarification au blanc d'œuf s'imposerait. Elle se ferait comme il a été dit pour la gélatine.

Nous conseillons absolument d'abandonner les anciennes méthodes consistant à faire bouillon et gélose d'un même coup; le résultat est médiocre le plus souvent, et encore est-il obtenu au prix de longs ennuis.

B. M. Roux conseille, pour la préparation de la gélose, la technique suivante qui donne aussi d'excellents résultats :

(1) Voici un excellent moyen de réaliser d'une façon complète et rapide la filtration à chaud.

Disposez la gélose fondue sur un entonnoir garni de papier Chardin, et placez l'entonnoir sur un vase qui recevra le produit filtré. Placez le tout dans l'autoclave et portez à 105-110° pendant quinze à vingt minutes. La filtration se fera à chaud *sous pression* d'une façon très régulière. Il n'y aura plus alors qu'à répartir dans les tubes à essai et à stériliser une dernière fois, comme il est dit ci-dessus.

A 1000 grammes de bouillon alcalinisé, peptonisé, ajoutez 15 grammes de gélose en morceaux; laissez digérer une heure à 100° en agitant; passez au tamis (sur une feuille de mousseline par exemple), laissez refroidir à 50° et ajoutez un blanc d'œuf. Mélangez intimement, chauffez à 110° pendant trois quarts d'heure au moins; filtrez enfin sur papier Chardin à chaud et répartissez dans les tubes stériles. Portez dans l'autoclave à 115° pendant quinze minutes.

2) *Gélose glycinée.*

Au lieu d'opérer sur un bouillon peptone, opérez sur un bouillon peptonisé et glyciné.

3) *Gélose pepto-glyco-glycinée.*

Prenez comme base de l'opération un bouillon pepto-glyco-glyciné.

La gélose a sur la gélatine un grand avantage: on peut l'exposer à la température de l'étuve (37° à 41°) sans qu'elle se liquéfie, comme le ferait la gélatine, qui fond au-dessus de + 18°. Le seul reproche qu'on puisse lui faire, c'est qu'elle est toujours légèrement louche.

Gélatine-gélose.

En été, il est bon de substituer à la gélatine trop facilement liquéfiable un milieu composé de gélatine et gélose, plus solide, et moins liquéfiable. Ajoutez pour obtenir ce mélange 1/2 p. 100 de gélose, lors de la préparation de la gélatine et veillez à ce que le liquide ne soit pas acide.

Sérum.

On le prépare en gélatisant par la chaleur le sérum du sang de bœuf, de veau, de cheval, de mouton, de chien. Les meilleurs sérums sont ceux

du mouton, du bœuf ou du cheval. Celui du chien n'est pas aussi bon, parce que la coagulation du sang est trop rapide dans cette espèce.

De la préparation du sérum nous décrirons deux méthodes: l'une qu'on peut appeler méthode de Nocard et Roux, est une méthode *rigoureuse* où le sérum est recueilli purement dans l'artère ou la veine même de l'animal. Cette méthode n'est malheureusement pas à la portée de tous les laboratoires, et le sérum doit alors être recueilli et traité suivant la seconde méthode, la méthode conseillée par Koch.

A. *Procédé de Nocard et Roux.* — On a préparé d'avance plusieurs des vases que nous avons décrits au chapitre I sous le nom de vases à sérum.

On apprête tout d'abord la *canule* qui doit être enfoncée dans le vaisseau de l'animal qui fournira le sang.

Cette canule (fig. 17) se termine

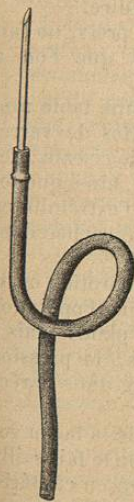


Fig. 17.

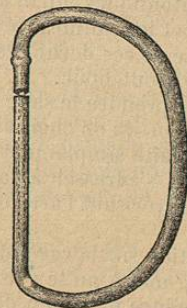


Fig. 18.

d'une part par un bec mousse taillé en biseau et de l'autre par une extrémité d'un diamètre supé-

rieur à celui du corps de la canule. Sur cette extrémité on adapte un tube de caoutchouc d'environ 0^m,40 de long.

L'appareil formé par la canule et le tube de caoutchouc qui lui est adapté doit être stérilisé.

A cet effet on introduit le bec de la canule dans l'extrémité libre du caoutchouc (fig. 18) ; l'appareil, qui prend alors une forme légèrement ovale, est soumis dans l'autoclave à + 115° pendant un quart d'heure. La stérilisation de la canule et de la surface intérieure du tube de caoutchouc sera ainsi parfaitement réalisée.

Il est bon de préparer deux de ces appareils afin d'être à l'abri de tout accident opératoire.

La canule, le vase à sérum étant prêts, on fait disposer pour l'opération l'animal que l'on a choisi.

L'opérateur place à sa portée sur une table une lampe à alcool, une ou deux baguettes de verre, un bistouri très propre, une paire de ciseaux, des pinces anatomiques, du fil à ligature, ainsi que les récipients et les canules stérilisés ; l'extrémité en bec de flûte de ces dernières demeure cachée dans le tube de caoutchouc.

On peut prendre le sang dans la carotide ou la jugulaire. Lorsqu'on choisit la jugulaire, l'opération peut être faite simplement et sans plaie ; mais il vaut mieux s'adresser à la carotide, la pression artérielle favorisant l'arrivée du sang dans le récipient.

L'opération sur la carotide se fait de la façon suivante : on met à nu le vaisseau et on le fait saillir avec une pince passée en dessous. On en cautérise la surface avec l'extrémité de la baguette de verre fortement chauffée sur la lampe à alcool et on incise avec le bistouri rapidement flambé. Le sang jaillit. On retire alors vivement le bec de la

canule du tube en caoutchouc, on en flambe la surface extérieure sur la flamme et on l'introduit dans le vaisseau : les doigts d'un aide en assurent la fixité. On fait aussi comprimer le tube de caoutchouc pour éviter toute perte de sang inutile. On saisit alors le vase à sérum ; on brise l'extrémité de la tige de verre qui le surmonte, et sur laquelle on a fait à l'avance, nous l'avons dit ailleurs, un trait de couteau à verre pour faciliter cette ouverture ; on flambe rapidement les bords de celle-ci, et on adapte la tige de verre sur l'extrémité libre du tube de caoutchouc. On fait cesser la compression exercée sur ce tube et le sang coule librement dans le récipient.

Lorsque ce premier vase est rempli, on fait à nouveau comprimer le caoutchouc pour arrêter l'écoulement du sang, on retire le vase ; on en apprête rapidement un second, qu'on adapte au tube de caoutchouc et qu'on laisse remplir comme le premier, et ainsi de suite. Lorsqu'on a rempli le nombre de récipients voulu, on retire la canule, on ligature l'artère, et on ferme la plaie par quelques points de suture.

On transporte les récipients dans un endroit frais après avoir enlevé la tige de verre qui les surmonte : il suffit pour cela de maintenir de la main gauche le tampon d'ouate qui recouvre le vase, tandis que la main droite enlève cette tige : l'ouate comble immédiatement le vide laissé par le passage de la tige.

La rétraction du caillot se fait en vingt-quatre ou quarante-huit heures ; il vaut mieux attendre quarante-huit heures.

Lorsque la rétraction du caillot est complète, on recueille le sérum.

Pour accomplir cette opération, prenez une pipette Chamberland stérilisée ; brisez l'extrémité

de l'effilure latérale et passez deux ou trois fois cette effilure dans la flamme de la lampe à alcool. Soulevez alors légèrement le tampon d'ouate du vase de sérum, *juste assez pour donner passage à l'effilure* de la pipette, et plongez celle-ci dans le sérum, *en ayant soin que son extrémité ne touche pas le caillot*, mais se rapproche des parois du vase, et aspirez.

Lorsque la pipette est remplie, on la retire, et on ferme l'extrémité de son effilure à la lampe. On procède ensuite à l'emplissage d'une nouvelle pipette, etc.

On place les pipettes remplies de sérum dans un endroit frais, et on laisse au repos douze heures au moins, de façon que les quelques globules rouges en suspension se déposent au fond du vase.

Cette série de manipulations donne un sérum transparent, jaune citron, que l'on peut conserver dans les pipettes aussi longtemps qu'on le désire ou qu'on distribue immédiatement dans les tubes à essai.

On prend pour cette opération des tubes à essai stérilisés et bouchés que l'on place sur une table, en même temps qu'un couteau à verre, une lampe à alcool, et la pipette Chamberland contenant le sérum.

On brise d'un trait de couteau à verre l'extrémité de l'effilure latérale de la pipette; on prend la pipette dans la main droite, et l'on stérilise l'effilure dans toute sa longueur sur la flamme de la lampe à alcool.

De la main gauche on saisit un tube à essai; on appuie solidement cette main sur le bord de la table, et l'on donne au tube qu'elle tient une direction presque horizontale. Le tube et la main doivent dès lors rester immobiles pendant toute l'opération du remplissage, car tout mouvement inopportun

ferait pénétrer de l'air dans le tube, et avec l'air des germes qui infecteraient le sérum. On passe une fois encore l'effilure de la pipette dans la flamme, et des doigts libres de la main droite on enlève le tampon d'ouate du tube à essai.

On introduit alors l'effilure dans le tiers supérieur du tube; on souffle par la tubulure supérieure de la pipette, et on remplit le quart du tube: il ne faut pas dépasser cette hauteur, car la couche de sérum trop épaisse se gélatiniserait difficilement. On retire l'effilure sans la laisser toucher à la paroi du tube, et on recouvre celui-ci de son tampon d'ouate. On recommence, pour chaque tube à remplir, la même opération.

Toutes ces manipulations doivent être faites vivement, ce qui diminue les chances d'infection.

Si l'opérateur avait quelques doutes sur la pureté de ses manipulations, il serait facile de se mettre à l'abri en soumettant les tubes remplis de sérum à l'étuve de + 37° pendant vingt-quatre à quarante-huit heures, et en rejetant après cette épreuve tout tube qui se serait troublé.

Le sérum ainsi distribué devra être *gélatinisé*.

Nous décrivons cette opération ci-dessous, après avoir parlé de la méthode de Koch.

Il est indiqué pour quelques cultures — celle du bacille de la tuberculose par exemple — de faire usage de *sérum glycérimé*.

« L'addition de la glycérine au sérum ne complique guère la technique: dans un ballon-pipette renfermant un poids connu de sérum pur, on aspire une quantité de glycérine stérilisée à 115° à l'autoclave, représentant 6 à 8 p. 100 du poids total. On mélange en agitant, et l'on distribue dans des tubes à essai. »

Les tubes remplis de sérum glycérimé seront traités comme les tubes de sérum simple, c'est-

à-dire *gélatinisés*. On devra noter, cependant, que pour solidifier le sérum glyciné il faut une température plus élevée que pour le sérum pur, 75° à 78° environ suivant la proportion de glycérine.

Nous avons dit ailleurs que le sérum pouvait être employé à l'état liquide. Les détails que nous avons alors donnés ci-dessus pouvaient présenter quelque obscurité que la description présente aura sans doute éclaircie. Le sérum est prêt pour les cultures en milieux liquides lorsqu'il a été purement réparti dans les tubes à essai. Il sera bon d'ailleurs de faire ce qu'on fait pour éprouver les bouillons : soumettre à l'étuve à + 37° pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures les tubes de sérum, rejeter ceux qui se seraient troublés, et ne garder que ceux qui ont conservé leur limpidité.

On peut d'ailleurs additionner le sérum d'une, deux ou trois parties d'eau, d'eau glycinée ou de bouillon. Il convient mieux alors à la culture de certains microbes.

B. *Récolte du sérum suivant la méthode de Koch.* — Préparez trois ou quatre cloches dites de Koch du modèle de celles qui servent aux cultures en plaques ou aux cultures sur pommes de terre, c'est-à-dire des appareils composés de deux grands cristallisoirs dont l'un, de plus grand diamètre, peut recouvrir l'autre, et stérilisez ces cloches par un lavage au sublimé à 1 p. 1000 ; on achève en passant à l'alcool qui enlève le sublimé.

Il est mieux encore d'avoir des cloches du même modèle, mais en verre de Bohême et sans bouton ; ces cloches se prêtent à la stérilisation à l'autoclave, qui donne encore plus de sécurité.

Muni de ces cloches stériles, l'opérateur se rend à un abattoir : l'opération se pratique fréquemment à Paris, et l'abattoir de Grenelle alimente de

sérum de bœuf nombre de laboratoires parisiens.

On découvre une des cloches, et on présente le cristallisoir inférieur au sang qui jaillit de la saignée pratiquée à l'animal abattu par la massue. Quand ce cristallisoir est rempli aux deux tiers environ, on le retire, on le recouvre du cristallisoir supérieur, et on agit de même pour remplir chacune des autres cloches.

On abandonne alors les appareils *sur place* dans un endroit frais et obscur pendant vingt-quatre à trente-six heures : le caillot se rétracte, le sérum est mis en liberté.

Au bout de ce laps de temps on procède à la répartition du sérum dans les tubes à essai. Cette répartition se fait sur place et de la façon la plus simple : 1° en aspirant le sérum du cristallisoir qui le contient dans des pipettes Chamberland stériles ; 2° en distribuant des pipettes Chamberland dans des tubes à essais stériles qu'on emplît au quart environ.

L'opération devra se faire d'une façon aussi aseptique que possible, mais la rigoureuse asepsie, nécessaire dans le procédé Nocard et Roux, n'est pas nécessaire ici, car le sérum recueilli par le procédé de Koch n'est pas exempt d'impuretés et une stérilisation est nécessaire.

La stérilisation des tubes à essai remplis de sérum se fait par la méthode de Tyndall, ce qu'on a appelé la *méthode du chauffage discontinu*.

Disposez les tubes de sérum dans un bain-marie réglé à + 58°. Les modèles de bain-marie avec régulateur existent chez les fabricants d'appareils et Wiesnegg en a construit un bon modèle muni du régulateur d'Arsonval, mais il est très facile de régler un bain-marie quelconque, fait extemporanément, avec un des nombreux thermostats existant actuellement, celui de Schloesing, celui de

Roux, le régulateur si simple et de prix modique de Chancel. Laissez les tubes pendant une heure, et répétez l'opération six jours de suite pendant une heure chaque fois.

Si le sérum doit servir à l'état liquide, il est prêt à ce moment : un séjour des tubes à l'étuve à $+ 37^{\circ}$ pendant quarante-huit heures donnera un surcroît de sécurité ; tout tube qui se troublerait serait à rejeter.

Si le sérum doit former — comme il est d'ordinaire — un milieu de culture solide, il faut le *gélatiser*.

Il est facile, dans le procédé de Koch, comme dans celui de Nocard et de Roux, d'avoir un sérum glycériné.

Il suffit d'aspirer outre le sérum la quantité voulue de glycérine stérile (voy. ci-dessus) dans les pipettes Chamberland qui recueillent le sérum dans les cristallisoirs. On achève comme ci-dessus en répartissant le mélange dans les tubes à essai et en soumettant au chauffage discontinu. Le sérum glycériné sera gardé à l'état liquide ou gélatinisé, suivant l'usage qu'on veut en faire.

C. M. Würtz donne l'indication d'un procédé simple pour recueillir dans le laboratoire de petites quantités de sérum sur les petits animaux, tels que le lapin et le chien.

« Supposons qu'on veuille recueillir dans le laboratoire une cinquantaine de centimètres cubes de sérum de chien ou de lapin. On dénudera une artère, la carotide par exemple, sur 3 centimètres de son parcours. On pince les deux extrémités du segment dénudé avec deux pinces à forcipressure, et on y introduit une canule de verre ou un trocart très fin.

» Un trocart très fin pour le lapin et les petits ani-

maux est d'un maniement plus commode que la canule.

» On lie la canule ou le trocart sur l'artère, on enlève la pince la plus rapprochée du cœur et on reçoit le sang dans une fiole stérilisée. Cette fiole doit être maintenue inclinée pendant la durée de la coagulation, de façon que, quand le sang est pris en caillot, il forme un plan incliné dans la fiole posée sur son fond plat. Au bout d'un certain temps, le sérum s'accumulera dans la partie déclive et on peut le recueillir facilement et le mettre en tubes sans lacérer le caillot avec la pipette.»

Les flacons d'Erlenmeyer se prêtent fort bien à cette opération. Le sérum recueilli est distribué dans des tubes, *tyndallisé*, et gélatinisé ensuite.

Gélatinisation du sérum.

Cette opération consiste à faire solidifier le sérum sous l'action d'une température convenable qui est $+ 65^{\circ}$. La solidification doit s'opérer le tube étant presque couché, de façon que le sérum solide forme une couche oblique s'étalant dans le tube.

Koch a fait construire un appareil spécial que représente la figure 19 ci-dessous. Les tubes sont naturellement maintenus au degré d'inclinaison voulue. L'appareil est muni, par nos constructeurs français, d'un régulateur d'Arsonval.

L'appareil est réglé entre 65° et 68° . Les tubes sont laissés le temps nécessaire pour obtenir la gélatinisation : on reconnaît que celle-ci est obtenue quand le sérum *est solidifié et prend une apparence ombrée, une demi-transparence spéciale*. Le temps nécessaire à la gélatinisation est variable ; ordinairement trente à soixante minutes suffisent. L'opération doit être minutieusement surveillée. Il faut retirer un tube dès qu'il est gélatinisé.

Au lieu de l'appareil de Koch on peut employer l'étuve d'Arsonval réglée entre 65° et 68°; on donne au tube l'inclinaison voulue, par tel ou tel artifice qu'il n'est pas nécessaire d'indiquer.

Nous gélatinisons facilement le sérum dans une petite étuve sèche de Wiesnegg, en ayant soin de laisser la température monter progressivement

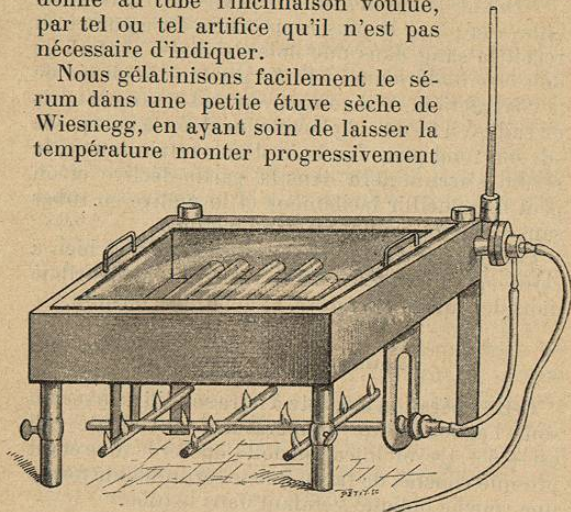


Fig. 19.

et lentement, et osciller dans les environs de 65-68°. Il faut surtout, dans ce cas, une surveillance minutieuse. Tout tube gélatinisé doit être immédiatement retiré.

Pommes de terre.

La technique actuelle a rejeté complètement le procédé primitif de Koch pour la culture sur pommes de terre.

La pomme de terre doit être préparée : 1° en cristalliseur clos; 2° en tube à essai.

Le premier procédé est une heureuse modification du procédé de Koch; le deuxième, qui tend à juste titre à devenir le *procédé d'élection*, est dû à M. Roux.

1° *Procédé de R. Koch modifié. Culture sur pommes de terre en grande surface, en cristalliseurs clos.* — On prend des pommes de terre de bonne qualité; on les lave avec une brosse, et on les plonge dans une

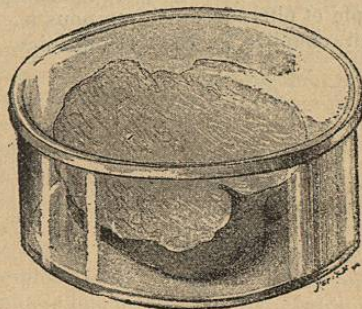


Fig. 20.

solution de sublimé à 1/1000 pendant une heure.

On lave dans la solution de sublimé des cristalliseurs à couvercle rodé, en verre de Bohême, de la forme représentée ci-dessus (fig. 20); on découpe dans une feuille de papier filtre des disques que l'on place sur le fond de chaque cristalliseur. On divise alors les pommes de terre en deux moitiés égales, dont chacune est placée dans un cristalliseur, sur le disque de papier-filtre, et l'on humecte celui-ci avec la solution de sublimé.

Les cristalliseurs fermés hermétiquement par leurs couvercles rodés sont placés dans l'autoclave, et soumis à + 100° pendant une heure, puis à + 115°

pendant au moins un quart d'heure. On éteint le gaz de l'appareil ; on laisse refroidir, et la pomme de terre est prête pour l'ensemencement.

On peut avec avantage se servir de cristallisoirs (fig. 21) présentant vers le tiers supérieur une ouverture sphérique d'un centimètre de diamètre environ, qu'on obture avec un tampon d'ouate. Cette petite ouverture sert à l'ensemencement, qu'elle rend plus simple et plus sûr, ainsi que nous le dirons au chapitre iv. Ces cristallisoirs

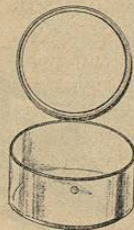


Fig. 21.



Fig. 22.

ont, comme les précédents, un couvercle rodé ; ils doivent être à paroi mince et en verre de Bohême pour pouvoir, sans se fendre, supporter les hautes températures auxquelles on les soumet.

2° Culture sur pommes de terre par le procédé de Roux. — M. Roux conseille de se servir, pour la culture sur pommes de terre, de tubes à essai de 2 centimètres et demi de diamètre environ (fig. 22). Les dimensions des tubes à pomme de terre sont d'ailleurs variables : il s'en fabrique actuellement de grande dimension, de dimension moyenne, et de la dimension enfin d'un tube à essai ordinaire. Les grands tubes (25 millimètres de diamètre) et

les tubes moyens (14 millimètres environ) sont les plus commodes. Ces tubes portent, vers le quart inférieur, un « étranglement qui empêche la tranche de pomme de terre de tomber au fond : dans la partie inférieure se rassemblera le liquide qui sort de la pomme de terre après cuisson » (Roux). Ces tubes sont bouchés à l'ouate, et il n'est pas nécessaire qu'ils soient stérilisés à l'avance.

On coupe des pommes de terre en tranches rectangulaires d'environ 3 centimètres de long sur une largeur variable avec le diamètre du tube, on les lave à l'eau, on les essuie sur un papier buvard ; puis on introduit chaque fragment dans un tube, on recouvre le tube de son tampon d'ouate sur lequel on place un capuchon de papier-filtre.

On place alors les tubes dans l'autoclave pendant une demi-heure à $+ 100^{\circ}$ et un quart d'heure au moins à $+ 115^{\circ}$ ou $+ 120$ degrés.

On voit combien la préparation des pommes de terre est simple, par ce procédé ; ajoutons que l'ensemencement se fait ici avec la même sûreté et la même rigueur que dans un tube de gélose ou de gélatine, et qu'enfin en modifiant légèrement la forme du tube on peut faire sur pomme de terre la culture des anaérobies, ce qui est absolument impossible avec tout autre procédé (voy. chap. v).