

un matras A contenant la culture donnée, prélevez *purement* avec une pipette quelques gouttes de liquide.

La manœuvre est simple : nous en avons indiqué, en traitant de la façon *d'ouvrir et de fermer purement les matras*, les éléments essentiels.

Ouvrez donc purement le matras A ; allez, avec une pipette bien flambée à l'extérieur, cueillir quelques gouttes du liquide qu'il contient ; fermez le matras A, prenez immédiatement, et sans déposer la pipette (1), le matras B à ensemer, ouvrez-le et portez-y une goutte de la semence dont est chargée la pipette.

4. *Ensemencement dans un bouillon d'une culture provenant d'un milieu solide.* — Que la culture provienne d'un tube de gélatine, de gélose, de sérum, d'une pomme de terre, la technique est la même. Recueillie purement avec un fil de platine, suivant des procédés que nous indiquerons en traitant des cultures sur milieux solides, la parcelle de culture prélevée est portée tout aussitôt dans le matras Pasteur, en observant toutes les précautions de règle.

B. *Mise à l'étuve à la température voulue.* — La température extérieure avec ses variations infinies, ses minima très bas, convient peu au développement cyclique parfait des cultures. Il est donc nécessaire de soumettre celles-ci, *quand le milieu de culture ne s'y oppose pas*, à une température de 35° à 40° qui permettra une multiplication régulière, normale et rapide des germes.

Nous avons, au chapitre III, indiqué les deux

(1) Il arrive parfois qu'une pipette chargée de semence ne peut être utilisée immédiatement, mais seulement après un court délai ; il conviendra dans ce cas de rejeter, en les laissant écouler de la pipette sur un papier-filtre (que l'on brûlera ensuite) les premières gouttes de la semence : onensemencera ensuite sans crainte.

modèles d'étuve qui nous semblent suffisants pour répondre à tous les besoins : l'étuve Roux qui sera de préférence l'étuve à usage général et sera en conséquence réglée d'une façon continue à 37-38° ; l'étuve d'Arsonval qui répondra aux indications particulières, permettant l'exposition des cultures à telle ou telle température précise.

II. — CULTURES DANS LES MILIEUX SOLIDES : GÉLATINE, GÉLOSE ET SÉRUM.

La gélatine, la gélose simple ou additionnée de glycérine, etc., le sérum sont contenus, nous l'avons dit au chapitre II, dans des tubes à essai.

La culture dans l'un quelconque de ces milieux comprend deux opérations *communes* :

- 1° L'ensemencement du milieu ;
- 2° La mise à la température voulue.

Ensemencer un de ces tubes comprend trois phases :

a) L'ouverture du tube ;

b) L'ensemencement proprement dit, ou *inoculation*, c'est-à-dire l'acte de déposer la semence dans l'épaisseur ou à la surface du milieu ;

c) La fermeture du tube.

Indiquons tout d'abord, et en tête de cet article, la manière *d'ouvrir* et de *fermer* un tube de culture *purement*, c'est-à-dire de façon à n'y introduire aucun germe étranger. Qu'il s'agisse d'un tube de gélatine, de gélose ou de sérum ; qu'il s'agisse de porter la semence dans le tube ou de l'y prélever, la technique est la même : en l'exposant ici nous éviterons des redites incessantes.

Pour *ouvrir* purement un tube de culture, placez-le entre le pouce et l'index gauches, le pouce en dessous, l'index en dessus ; donnez-lui entre ces

deux doigts une position ou *horizontale* ou à *peine inclinée* (1) : enlevez le bouchon d'ouate, en lui imprimant un mouvement de torsion, avec la main droite, et placez-le entre deux des doigts de la main gauche.

Dès qu'il est débouché, le tube doit rester *immobile* dans la main qui le tient, et celle-ci doit, pendant toute l'opération, quelle qu'elle soit, garder une position invariable. On évitera, en suivant strictement ces règles, que les germes atmosphériques ne viennent souiller la surface du milieu de culture.

Pour *fermer* le tube, remplacez le bouchon et seulement alors redressez le tube ; chauffez ensuite fortement les parois du tube au niveau du tampon d'ouate sur la flamme, en ayant soin de ne pas carboniser l'ouate ; ce flamage détruira tous les germes dont le tampon ouaté aurait pu se charger pendant son exposition à l'air. Enfin, pour préserver l'ouate de toute souillure ultérieure, pour éviter l'évaporation, coiffez le tube du manchon de papier filtre dont il était pourvu avant l'opération, ou d'un capuchon de caoutchouc : cette dernière pratique doit être préférée quand il s'agit de cultures qu'on veut garder longtemps, ou de cultures qui doivent séjourner quelque temps à l'étuve (gélose, sérum).

Les capuchons de caoutchouc doivent être *rigoureusement désinfectés*. Il faut absolument proscrire l'usage des capuchons non privés de germe : il arrive presque infailliblement dans ce cas en effet que la culture se souille de germes étrangers qui du capuchon pénètrent l'ouate humide, la traversent,

1) Dans le cas tout particulier où l'opération porte sur un tube de gélatine liquéfiée il va sans dire que la position à donner ne peut être l'horizontale. On se bornera à placer le tube dans une position aussi inclinée que possible.

tombent sur le milieu nutritif, et y colonisent.

Pour désinfecter les capuchons de caoutchouc placez-les dans un récipient en verre de Bohême bouché à l'ouate et soumettez à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes. Portez le récipient au sortir de l'autoclave dans l'étuve à + 37° pour sécher les capuchons. C'est dans ce récipient stérile qu'avec une pince flambée on ira saisir les capuchons au fur et à mesure des besoins.

La stérilisation pourrait être encore obtenue par l'immersion dans la solution de sublimé à 1 p. 1000 pendant une demi-heure, l'immersion dans l'alcool au sortir du bain de sublimé, enfin le séchage à l'étuve au sortir du bain d'alcool.

Cultures sur la gélatine.

La gélatine est de deux façons répartie dans les tubes à essai, ainsi que nous l'avons dit ailleurs :

a) Elle forme un cylindre remplissant exactement le tiers inférieur du tube ;

b) Elle est étalée en couche oblique reposant sur une seule paroi, et allant en s'amincissant vers la partie supérieure du tube.

Nous désignerons, par ellipse, les tubes de la première catégorie sous le nom de *tubes droits*, ceux de la deuxième sous le nom de *tubes obliques*.

Les tubes droits serontensemencés par *piqûre* ; les tubes obliques serontensemencés par *strie*.

ENSEMENCEMENT DE LA GÉLATINE PAR PIQÛRE. — 1° *Technique générale*. — Le tube de gélatine étant ouvert avec toutes les précautions de règle, portez avec la main droite le fil de platine stérilisé et chargé de la semence à son extrémité dans l'intérieur du tube, et piquez-le *droit* dans l'axe du

cylindre gélatineux, en ayant soin de le pousser jusqu'au fond du tube; ceci fait, retirez doucement le fil de platine, et fermez le tube.

2° *Technique des diversensemencements par piqûre dans la gélatine.* — Comme nous l'avons fait pour lesensemencements dans les milieux liquides, nous allons passer rapidement en revue les cas divers qui se présentent dans la pratique desensemencements par piqûre.

1. *Ensemencement des produits recueillis à l'autopsie.* — Ces produits sont contenus dans des pipettes fermées, l'ensemencement immédiat et direct avec la pipette n'étant pas possible ici comme il l'était pour les matras.

L'opération comprend deux temps: on va d'abord, suivant la technique que nous avons exposée ailleurs, cueillir avec le fil de platine stérilisé, la semence dans la pipette ouverte et flambée à son extrémité; puis on porte par piqûre cette semence dans le tube de gélatine.

2. *Ensemencement d'une culture provenant d'un milieu liquide.* — Ouvrez purement le matras qui contient la culture; avec le fil de platine stérilisé allez cueillir une goutte de liquide, et piquez-la dans le tube de gélatine.

3. *Ensemencement d'une culture provenant d'un milieu solide transparent ou demi-opaque.* — La technique est la même, que le tube où l'on va puiser la semence soit un tube de gélatine, de gélose ou de sérum, et qu'il contienne ces milieux nutritifs sous forme de cylindre droit ou sous forme de couche oblique.

Placez les deux tubes, le tube qui porte la culture et le tube à enssemencer, côte à côte entre le pouce et l'index gauches, le pouce étant en dessus, et donnez-leur une position *exactement horizontale*, ou *très légèrement inclinée*. Enlevez les bouchons

d'ouate de l'un et l'autre tube, et posez-les entre les doigts libres de la main gauche dans le même intervalle ou à des intervalles différents. Avec l'aiguille de platine stérilisée, allez puiser la culture dans le tube enssemencé, et piquez-la immédiatement dans l'autre tube. Achevez l'opération en fermant aussitôt les deux tubes.

Un cas particulier est celui où la semence doit être puisée dans un tube de gélatine liquéfiée; il faudra dans ce cas donner aux deux tubes disposés entre le pouce et l'index gauches, non plus la position *horizontale* que la liquéfaction de l'un d'eux rend impossible, mais une position aussi voisine qu'il se pourra de l'*horizontale*.

L'opération se fera d'ailleurs, sauf cette modification, comme nous l'avons indiqué ci-dessus.

4. *Ensemencement d'une culture provenant d'un milieu opaque.* — Aller prendre purement (nous dirons plus tard de quelle façon) sur la pomme de terre, etc., une parcelle de semence, à l'aide du fil de platine stérilisé, et piquez-la dans la gélatine.

ENSEMENCEMENT DE LA GÉLATINE PAR STRIE. — En règle générale, pour réussir un enssemencement par strie, il faut choisir de la gélatine fraîchement préparée. La gélatine ancienne s'écaille sous la pointe du fil de platine ou sous la friction de la palette de platine et le résultat obtenu est défectueux. Cette règle s'applique également à la gélose.

1° *Technique générale.* — Le tube étant ouvert, introduisez le fil ou la palette de platine chargés de la semence, et promenez-en doucement l'extrémité sur la surface de la gélatine de la profondeur du tube vers l'ouverture. La strie peut se faire aussi à l'aide de la pipette chargée de semence liquide, et dont on promène doucement l'extrémité finement effilée sur la surface gélatineuse: une goutte de semence se dépose en trainée.

2° Des diversensemencements par strie sur la gélatine. — Ce serait une redite inutile que de décrire ici l'ensemencement par strie sur la gélatine des produits recueillis à l'autopsie dans des pipettes, des cultures provenant de milieux solides, transparents, demi-opaques et opaques. La technique spéciale est la même en tout point que dans le cas d'ensemencement par piqûre, et nous prions le lecteur de s'y reporter. Seul le mode d'inoculation diffère : le fil de platine porteur de la semence est promené sur la surface de la gélatine, au lieu d'être piqué dans son épaisseur.

La pipette Pasteur sera toutefois employée facilement avec avantage, pour ensemenecer en strie sur gélatine les produits qu'on vient de recueillir à l'autopsie. Il suffira de promener la pointe de la pipette chargée du sang, d'un liquide pathologique, etc., sur la surface du milieu pour l'ensemencer ; on donnera une légère inclinaison à la pipette, de façon qu'en touchant le milieu de culture elle laisse une trainée de semence. Parfois la semence ne tombe pas d'elle-même de l'effilure de la pipette ; il faut souffler légèrement par l'extrémité opposée de la pipette pour déterminer l'issue de la semence.

Pour les produits en provenance de milieux de culture liquides ou liquéfiés (gélatine liquéfiée), nous conseillons de rejeter le fil de platine et de procéder avec la pipette de la façon suivante : Effilez très finement sur la lampe à alcool l'extrémité d'une pipette, de façon à la terminer par un tube capillaire dont vous briserez la pointe. Allez cueillir purement avec cette pipette, dans le matras de bouillon ou dans le tube de gélatine liquéfiée, quelques gouttes du liquide de culture ; introduisez la pipette dans le tube de gélatine, et promenez son extrémité sur la surface de la

gélatine : le liquide s'y déposera en fine trainée.

Ce procédé élégant nous conduit à parler d'une méthode générale de transplantation des cultures en provenance d'un milieu solide, quel qu'il soit (gélatine, gélose, sérum, pomme de terre) sur un nouveau milieu solide quel qu'il soit.

Le procédé que nous avons décrit pour transporter sur la gélatine une culture sur milieu solide en provenance de la gélatine, de la gélose, du sérum, de la pomme de terre, se résume en ceci : aller avec un fil de platine recueillir la semence sur le milieu solide, et la piquer dans le cylindre gélatineux, ou la déposer en trainée sur la surface étalée de la gélatine avec ce fil de platine.

Ce procédé est bon et correct, mais il présente le léger inconvénient que voici : la semence fait une trainée apparente sur le nouveau milieu, et l'observation de son développement s'en trouve gênée.

Pour éviter cet inconvénient, qui se reproduit avec la gélose, le sérum et la pomme de terre comme avec la gélatine, procédez de la façon suivante :

Recueillez avec un fil de platine stérilisé la semence sur le milieu solide ; portez-la dans une pipette stérile A que vous aurez remplie de bouillon stérile et qui, pour recevoir la semence, sera coupée, ouverte et flambée comme il a été dit bien des fois. Répandez la semence dans le bouillon en agitant le liquide avec le fil de platine.

Retirez alors le fil de platine qui ne porte plus aucune parcelle compacte de semence à la surface, mais est seulement mouillé par le bouillon ensemenécé, et piquez-le dans le tube de gélatine droit qui doit être ensemenécé.

Si l'opération doit porter sur la gélatine, la gélose, le sérum à surface obliquement étalée ou sur la

pomme de terre, introduisez dans la pipette A où la semence vient d'être délayée une pipette B *finement effilée* à son extrémité; cueillez quelques gouttes du liquide de A et portez la pipette B dans le tube de gélatine, gélose ou sérum, ou sur la pomme de terre; la pipette promenée à la surface de ces milieux y déposera le liquide d'ensemencement en fine trainée.

Cette manœuvre, qui est infiniment moins compliquée que la description ne le laisserait supposer, donnera avec un peu d'adresse et d'habitude d'excellents résultats : la semence étant déposée sous forme insensible à la surface du milieu de culture, son développement sera aussi facile qu'intéressant à suivre.

Les cultures sur gélatine, précieuses parce qu'elles permettent d'observer des formes de développement souvent caractéristiques, ont l'inconvénient de ne pouvoir être portées à l'étuve réglée aux températures ordinaires, où elles se liquéfient; elles seront donc laissées à la température atmosphérique, et placées soit dans des vases garnis de coton au fond, soit dans des supports en bois, ou mieux encore *elles seront mises dans une étuve d'Arsonval réglée entre 18 et 22°*. L'hiver, ce séjour à l'étuve sera de règle.

Cultures sur la gélose.

La gélose est, ainsi que nous l'avons dit, répartie dans les tubes à essai soit en cylindre plein, soit, et plutôt, en plaque étalée. Tout ce que nous avons dit sur l'ensemencement des tubes de gélatine par *piqûre* et par *strie*, sur la manière d'*ouvrir* et de *fermer purement* les tubes, d'y transporter la *semence de provenances diverses*, s'applique absolument aux cultures sur la gélose : il est donc inutile de répéter ici l'article précédent.

Les cultures sur gélose seront mises à l'étuve Roux, ou à l'étuve d'Arsonval suivant le cas.

Cultures sur sérum.

Nous pouvons dire de la culture sur le sérum ce que nous disions de la culture sur la gélose, c'est-à-dire renvoyer le lecteur pour la pratique de ces cultures, à notre article sur la gélatine.

Ajoutons seulement que le sérum ne se cultive que sous forme étalée; son peu de transparence en ferait un milieu impropre à l'observation du développement des cultures, s'il était réparti dans les tubes en cylindre plein.

Cultures sur milieux opaques.

La pomme de terre représente le type de ce genre de milieux. Nous la prendrons pour exemple :

On appliquera aux autres milieux opaques tout ce que nous dirons de la pomme de terre.

On doit, nous l'avons dit au chapitre IV, cultiver la pomme de terre suivant deux procédés :

1° En petits cristallisoirs clos, suivant la méthode de Koch modifiée;

2° En tubes d'essai, d'après la méthode de Roux.

1° CULTURE EN CRISTALLISOIRS CLOS. — La technique générale diffère suivant que le cristallisoir est ou non muni d'une ouverture latérale.

a) *Cristallisoirs sans ouverture latérale*. — Soulevez obliquement, et très peu, le couvercle du cristallisoir; portez la pipette ou le fil de platine chargés de la semence sur la surface de la pomme de terre et déposez, en traçant des stries super-

ficielles, la semence sur cette surface. Remplacez le couvercle, et portez l'appareil à l'étuve.

b) *Cristallisoirs à ouverture latérale*. — Enlevez le tampon d'ouate qui garnit l'ouverture; glissez par l'orifice la pipette ou le fil de platine portant la semence, et déposez cette semence en stries sur la pomme de terre; remplacez le tampon d'ouate après l'avoir passé rapidement dans la flamme et portez l'appareil à l'étuve.

Nous conseillons d'employer la pipette à *extrémité finement effilée* pour l'ensemencement des pommes de terre aussi souvent qu'il sera possible de le faire. Avec la pipette on portera directement sur la pomme de terre les cultures provenant de milieux liquides ou liquéfiés; on y portera aussi, suivant la méthode générale que nous avons exposée ci-dessus, tous les produits de culture en provenance de milieux solides.

Le fil de platine et surtout la palette de platine seront employés à défaut de la pipette, et dans les circonstances où celle-ci est inutilisable; ils remplissent d'ailleurs parfaitement le but.

2° MÉTHODE DE ROUX. — Dans les tubes contenant une tranche de pomme de terre, tubes dont la forme et la préparation ont été décrites ailleurs, l'ensemencement est d'une extrême facilité, et se fait *comme dans un tube de gélatine ou de gélose*.

Ouvrez le tube qui contient la pomme de terre avec les précautions d'usage, c'est-à-dire en lui donnant une inclinaison telle que les germes atmosphériques ne puissent y tomber. Portez la semence contenue dans une pipette finement effilée, ou à l'extrémité d'un fil de platine, sur la surface de la pomme de terre, et déposez-la en traçant quelques stries superficielles.

Rebouchez le tube, flambez le verre au niveau

du tampon d'ouate, couvrez l'extrémité d'un capuchon de papier-filtre ou de caoutchouc, et portez à l'étuve.

Tel est ce procédé qui fait de la culture sur pomme de terre, autrefois si compliquée, si peu sûre, un procédé qui égale en simplicité et en sûreté la culture sur milieux transparents.

Cultures sur plaques.

Nous allons décrire ici un procédé tout spécial imaginé par Koch et dont l'introduction dans la technique microbique a constitué un très grand progrès. L'isolement du bacille du choléra a été obtenu par cette méthode.

La culture sur plaques se fait dans la gélatine pure, ou dans la gélatine additionnée de gélose (voy. chap. II), ce qui rend le milieu plus rapidement solidifiable, et moins facilement liquéfiable aux hautes températures de l'été.

Elle peut aussi — avec une légère modification que nous indiquerons — se pratiquer sur gélose. Enfin il existe une méthode de séparation des germes due à M. Loeffler, et dont MM. Roux et Yersin ont su tirer le plus brillant parti pour l'isolement des germes de la diphthérie. Cette méthode de séparation, possible avec la gélose, a été surtout pratiquée avec le sérum.

Nous prendrons pour type de notre description la culture en plaques sur gélatine et gélatine-gélose. Nous indiquerons ensuite les particularités propres à la méthode de culture sur gélose.

Cultures en plaques sur gélatine.

Le principe général de la méthode est le suivant :

On répand dans une faible quantité de gélatine (ou de gélatine-gélose) liquéfiée un nombre de germes aussi faible que possible. Puis on fait solidifier le milieu en l'étalant sur une surface plane. Les germes se diffusent et se développent, chacun isolément, là où ils ont été emprisonnés par la solidification.

La culture sur plaques se prête admirablement à trois opérations :

1° Isolement des divers germes contenus dans un milieu quelconque; eau, sol, matières fécales, tissus, etc.

2° Purification d'une culture impure par la séparation des espèces microbiennes qu'elle contient.

3° Étude de la forme que prend la colonie pure de tel ou tel microbe; cette forme est parfois caractéristique pour un microbe (fièvre typhoïde, choléra, etc.).

Nous décrivons :

A. *Le procédé classique de Koch;*

B. Une modification de ce procédé qui, dans certains cas, peut remplacer avec avantage la méthode un peu compliquée de Koch (*méthode d'Es-march*);

C. Un excellent procédé dû à Roux, procédé dont l'indication a été donnée par lui dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (1887, p. 25);

D. Enfin le procédé de Petri, qui tend à juste titre à devenir le procédé d'élection, et qui a rendu plus simple et plus pratique la méthode de Koch.

Culture sur plaques par la méthode de Koch.

Nous exposerons ce procédé en supprimant tout ce qui n'est pas essentiel, et constitue une surcharge

d'appareils inutile, et en introduisant d'autre part les modifications aujourd'hui partout adoptées. Les instruments nécessaires sont :

1° Le petit tambour métallique de Roux supporté par des vis calantes qui permettent de placer l'appareil dans l'horizontalité parfaite. Deux ajutages

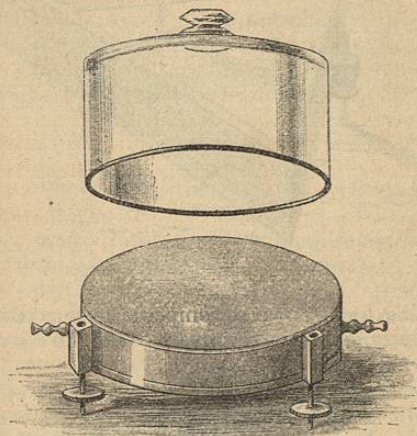


Fig. 40.

latéraux sont disposés de façon qu'une circulation d'eau puisse se faire à l'intérieur du tambour (fig. 40).

Une cloche en verre, et un niveau d'eau complètent ce petit appareil très simple.

A défaut de l'appareil de Roux on devra disposer :

D'un triangle en bois à vis calantes (fig. 41);

D'une large plaque de verre;