

D'un cristalliseur recouvert d'une plaque de verre très large;
D'un niveau à bulle d'air;

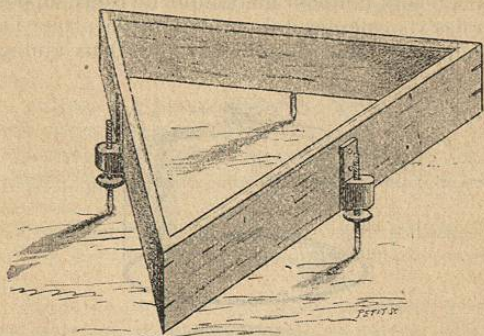


Fig. 41.

2° Une cloche en verre composée de deux parties :
a) Un cristalliseur, recouvert par b), un couvercle

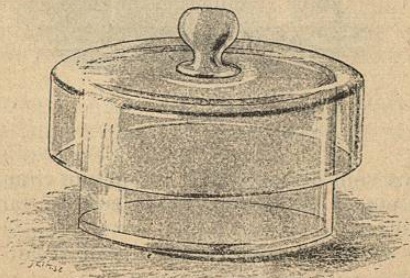


Fig. 42.

de même forme, plus grand et portant sur sa face supérieure un bouton de verre (fig. 42);

3° De petits bancs en verre (fig. 43);
4° Des plaques de verre stérilisées et contenues jusqu'au moment où elles devront être mises en usage dans une boîte en tôle stérilisée. Nous avons

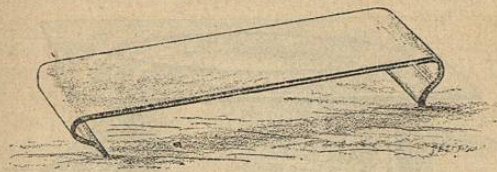


Fig. 43.

décrit ailleurs cette partie de l'appareil et sa stérilisation.

Pour mieux faire saisir l'économie générale de l'opération nous choisirons un exemple :

On a dans un tube de gélatine, dans un matras, une culture impure contenant un grand nombre de germes différents, ou bien encore on vient d'ensemencer un tube de gélatine, un matras avec une goutte, une parcelle d'une substance qu'on sait chargée d'une quantité de germes divers (eau, terre, matières fécales, etc.).

Il s'agit de trier ces germes, de les isoler, d'en faire, en un mot, la culture sur plaques.

L'opérateur commence par se laver et brosser soigneusement les mains, qu'il trempe ensuite dans la solution de sublimé à un millième.

Il prépare alors l'appareil de Roux en l'établissant dans l'horizontalité parfaite au moyen du jeu des vis calantes, et établit par les ajutages une circulation d'eau froide à l'intérieur du tambour.

A défaut de l'appareil de Roux on disposera le triangle à vis calantes A sur une table; sur ce triangle on placera une large plaque de verre B;

celle-ci recevra le cristalliseur rempli d'eau froide ou de glace jusqu'au bord, et le cristalliseur sera recouvert de sa plaque de verre E (fig. 44).

L'appareil sera placé dans l'horizontalité parfaite

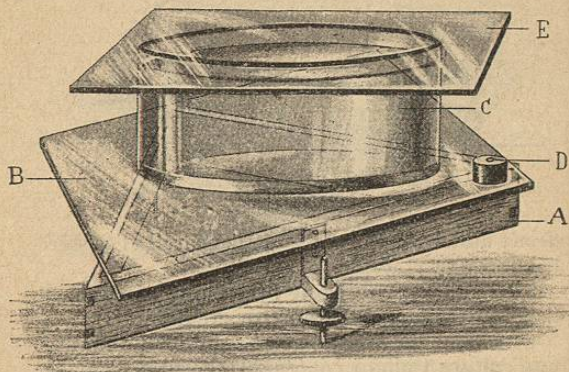


Fig. 44.

au moyen du jeu des vis calantes du triangle en bois.

Il faut alors préparer la cloche, en faire, suivant l'expression connue, une *chambre humide aseptique et antiseptique*. A cet effet les deux parties qui la composent ayant été d'abord soigneusement nettoyées, on place dans le cristalliseur *une feuille de papier-filtre* taillé en rond, et d'un diamètre un peu moindre que le diamètre intérieur de ce cristalliseur ; on verse dans chacune des deux parties de la cloche une *solution de sublimé* à 1 p. 1000 ; on la promène sur toute la surface intérieure du cristalliseur ; on vide complètement le cristalliseur supérieur, mais on ne fait écouler qu'en partie la solution désinfectante du cristalliseur inférieur ; on y

laisse la quantité nécessaire pour tenir le papier-filtre humide. On ferme la cloche, et on la place sur la plaque de verre.

On dispose alors à portée, dans un récipient rempli de sublimé au millième, trois bancs de verre, et aussi dans ce même récipient trois bandes de papier-filtre de la largeur et de la longueur des bancs de verre ; on numérote I, II, III, ces bandes de papier.

On place encore à portée la boîte en tôle contenant les plaques de verre stérilisées, une lampe à alcool, un fil de platine fort, et des pipettes.

On prend alors trois tubes de gélatine faiblement remplis : en hiver on se servira de gélatine pure ; en été on prendra de la gélatine additionnée de gélose.

On porte ces tubes à l'étuve ou dans un bain-marie à 37-40° pour les liquéfier.

Le contenu du tube O qui renferme la culture dont les germes doivent être isolés sera lui-même rendu liquide de la même façon, s'il ne l'est déjà.

On saisit alors le tube O ; on le place entre le pouce et l'index de la main gauche, côte à côte avec un des tubes de gélatine fondue à l'étuve ou au bain-marie. On débouche l'un et l'autre tube ; avec une pipette stérilisée (1), et dont l'effilure vient d'être passée dans la flamme de la lampe à alcool, on aspire un peu du liquide du tube O, et on en porte une goutte dans un des tubes de gélatine. Ce tube sera immédiatement bouché et marqué I. On l'agitiera légèrement pour répartir la semence dans toute l'épaisseur de la gélatine.

Si la culture impure est contenue dans un matras, l'opération est aussi simple : avec la pipette

(1) La pipette nous paraît remplacer avantageusement le fil de platine fin, terminé en anneau, que les Allemands emploient dans le même but.

on prélève un peu du liquide du matras et on en reporte une goutte dans le tube de gélatine I.

Dans ce tube I on prélève avec une nouvelle pipette un peu de liquide, dont on laisse par le même procédé tomber une goutte dans le second tube de gélatine liquéfiée : on marque ce tube II ; on le bouche ainsi que le tube I et on répand la semence dans son contenu en agitant légèrement. Du tube II on porte par la même manœuvre avec une nouvelle pipette une goutte dans le troisième tube de gélatine : tube III.

On doit veiller à ce que les tubes I, II, III, restent toujours en état de liquéfaction jusqu'au moment où on les verse sur les plaques de verre ; il est bon de les plonger dans un bain-marie tiède, s'ils ont de la tendance à la solidification.

On couche alors la boîte de tôle, contenant les plaques, horizontalement sur le bord d'une table ; on retire le couvercle ; on saisit une plaque avec une pince flambée et on la pose sur le tambour de Roux, ou sur la plaque supérieure de l'appareil réfrigérant de Koch, et on protège la plaque par la cloche dont est muni à cet effet l'appareil de Roux, ou par un cristalliseur approprié, s'il s'agit de l'appareil de Koch.

Il s'agit maintenant de répartir le contenu du tube I sur cette plaque. A cet effet on fait soulever légèrement par un aide la cloche ou le cristalliseur qui protège la plaque. On débouche le tube I, on flambe fortement ses bords à la flamme de gaz ou d'alcool, et on en verse le contenu, ou partie du contenu, suivant les dimensions de la plaque de verre, sur celle-ci. Avec le bord *flambé* du tube on étale la gélatine régulièrement sur la plaque de verre. On remet le couvercle protecteur en place et on laisse, à l'abri des souillures atmosphériques, la gélatine refroidir et faire prise.

Pendant que la gélatine fait prise, on apprête la cloche qui doit recevoir les plaques.

On place dans le cristalliseur inférieur de la cloche de Koch, sur le papier-filtre humide, un banc de verre qu'on retire à cet instant de la solution de sublimé où il était plongé, qu'on laisse égoutter une seconde, et qu'on recouvre du papier-filtre I. On renferme aussitôt la cloche.

Quand la gélatine a fait prise sur la plaque, on enlève cette plaque, et on la porte aussi rapidement que possible dans la cloche sur le banc de verre : on la dispose son grand axe perpendiculaire à celui du banc de verre.

Avant de refermer la cloche on dispose sur le premier banc de verre un autre banc de verre recouvert de son papier filtre II. Les axes des deux bancs doivent être parallèles, les pieds du second portant entièrement sur la face supérieure du premier.

On referme la cloche.

On dispose alors une nouvelle plaque sur le tambour de Roux, ou sur l'appareil réfrigérant de Koch : on y verse avec les précautions ci-dessus énumérées le contenu du tube II ; on laisse faire prise et on porte dans la cloche sur le banc de verre II. Sur ce banc de verre on dispose aussitôt un nouveau banc recouvert du papier filtre III : ce banc recevra la plaque qui portera le contenu du tube III, que l'on traitera comme il est dit ci-dessus.

Quand la dernière plaque est en place, l'opération est terminée. La cloche avec ses bancs de verre supportant les plaques prend la figure représentée ci-après (fig. 45).

On devra s'abstenir, avant le moment opportun, c'est-à-dire avant un développement suffisant des colonies, de toute ouverture intempestive de la

cloche, qui permettrait aux germes aériens de se déposer à la surface des plaques.

En règle générale, la plaque I, qui occupe le rang inférieur, est trop chargée de germes, et souvent liquéfiée en totalité ou en partie : les

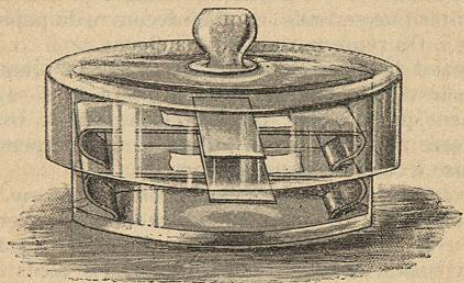


Fig. 45.

plaques II et III se prêtent mieux à l'examen et à la prise des colonies.

Il convient, quand l'opération est achevée, de porter la cloche qui contient les plaques dans une étuve réglée de 18 à 22°, comme on le fait pour les tubes de gélatine.

Il faut maintenant décrire l'*examen des plaques* et le *prélèvement des colonies*.

Examen des plaques. — Portez sur la platine du microscope (cette platine doit être large, et tous les microscopes à l'usage bactériologique sont aujourd'hui pourvus d'une telle platine) la culture en plaque. Écartez l'éclairage Abbe, servez-vous du plus petit diaphragme et d'un faible grossissement. Vous apercevrez, en faisant passer la plaque sous l'objectif, des colonies de formes diverses.

Prélèvement de la colonie — Si vous voulez cueillir

une de ces colonies, prenez un fil de platine bien stérilisé, ou de préférence une pipette finement effilée et légèrement recourbée à son extrémité. Nous conseillons plutôt la pipette ainsi préparée, à cause de sa fixité plus grande, que le fil de platine dont l'extrémité oscille souvent d'une façon gênante. Procédez alors de la façon suivante :

Si la colonie à cueillir est bien isolée, bien en vue sous l'objectif, allez directement la cueillir avec le fil de platine ou la pipette en dirigeant la manœuvre de l'œil.

Si la colonie est entourée d'autres colonies à proximité, et par conséquent mal isolée, maintenez l'œil sur le microscope; dirigez par tâtonnement l'extrémité de votre fil de platine ou de votre pipette jusqu'à ce que vous l'aperceviez sous l'objectif au milieu de la colonie choisie. Piquez alors celle-ci, et chargez-en l'extrémité de l'instrument.

Dans l'un et l'autre cas on verra que l'opération a réussi lorsque la colonie aura disparu du champ du microscope et qu'il ne restera plus à sa place qu'une surface de gélatine dissociée.

La colonie enlevée sera immédiatement ou examinée sur lamelle, ou ensemencée dans un tube de gélatine, gélose, etc.

Nous avons dit en commençant cet article que la culture sur plaques permettait d'étudier la forme que prend la colonie d'une bactérie donnée. Lorsque possédant une culture pure de tel ou tel microbe on désire connaître la forme des colonies de ce microbe sur la gélatine, on procède de la façon que nous avons indiquée, mais il n'est pas nécessaire alors de faire un aussi grand nombre de plaques : une ou deux suffisent, la première contenant une goutte de la culture originale, la deuxième contenant une goutte du tube d'ensemencement de la première plaque: on aura de

cette façon sur l'une et l'autre plaque des colonies suffisamment isolées.

Cultures sur plaques par la méthode d'Esmarch.

Esmarch a proposé de modifier la méthode de Koch de la façon suivante :

« Il se sert d'un tube à essai ordinaire stérilisé, renfermant de la gélatine nutritive, et bouché par un tampon d'ouate. On liquéfie à une douce chaleur, et on y sème avec un fil de platine ou une pipette stérilisée une trace du liquide à examiner (eau, sang, pus); on replace le tampon de coton et on agite lentement deux ou trois fois de façon à répartir également les germes dans la gélatine. » (Straus, *Annales Pasteur*, t. I, p. 93.)

On répartit alors uniformément sur la surface interne du tube à essai la gélatine qu'il contient, et on la laisse s'y solidifier en plaçant le tube, horizontalement maintenu, sous le robinet d'eau froide et en lui imprimant un mouvement rapide de rotation; on a alors la *plaque enroulée* d'Esmarch.

Au bout de quelques jours, suivant la température, on voit apparaître à la face interne du tube les colonies bactériennes, qui se comportent comme celles qu'on observe sur les plaques ordinaires. On peut les examiner à la loupe, ou à un faible grossissement au microscope. Si on veut prélever une parcelle d'une colonie pour l'examiner au microscope ou la semer, on se servira d'une aiguille de platine comme à l'ordinaire; cette recherche peut se faire aussi aisément au microscope, l'aiguille pouvant être appliquée contre le rebord de l'ouverture du tube, ce qui a l'avantage de donner un point d'appui facilitant la manipulation.

Le procédé d'Esmarch présente sur celui de Koch l'avantage qu'on peut, sans crainte d'infection

de la nappe de gélatine, examiner les colonies, et les cueillir.

Un point défectueux est la forme droite du tube: on ne saurait en effet donner à ce tube une horizontalité parfaite pendant les manœuvres du refroidissement, sous peine de mouiller le tampon d'ouate avec la gélatine et de déterminer d'abord l'adhérence de ce tampon à la surface de la gélatine et plus tard la souillure de celle-ci.

Cultures sur plaques par le procédé de Roux.

Roux a indiqué un procédé de cultures sur plaques qui a l'avantage de permettre la conservation pure des microbes à évolution très lente, tels que celui de la tuberculose.

Aux plaques il substitue « des tubes de verre longs de 25 à 30 centimètres et larges de 2 à 3 centimètres (fig. 46). Une petite quantité de gélatine, de gélatine et gélose ou de gélose glycé- rinée (suivant les cas) est introduite au fond des tubes, que l'on ferme avec un tampon de coton et que l'on stérilise à l'autoclave à 115°. Pour les utiliser il suffit de faire fondre la gelée nutritive, et de l'ensemencer alors qu'elle est encore liquide.

» On agite vivement, et on couche le tube sur un plan horizontal: la gelée nutritive s'étale et se moule sur la paroi inférieure du tube. Elle est ainsi répartie sur une grande surface, et si l'ensemencement a été convenablement fait, les colonies qui se développeront seront



Fig. 46.

parfaitement isolées. La couche solide doit être mince pour que l'on puisse facilement examiner les colonies, au microscope, à travers le verre. Le tube est fermé avec un capuchon de caoutchouc, et il peut rester à l'étuve, le cas échéant, aussi longtemps qu'il est besoin, sans se dessécher. Il est facile de l'examiner, et même de faire une prise dans une colonie isolée sans avoir à craindre l'introduction des germes étrangers de l'air.

» S'il se forme des colonies à la superficie de la couche nutritive, et s'il est nécessaire de les examiner par leur surface libre, avec un diamant monté sur une tige rigide, on fait un trait sur la paroi intérieure du tube de chaque côté et parallèlement à la surface de la gelée nutritive; on sépare ainsi le tube en deux demi-cylindres dont l'un contient la culture étalée. Il est facile d'examiner cette gouttière tout comme une plaque sur la platine du microscope. »

Procédé dit des boîtes de Petri.

Les boîtes de Petri sont, nous l'avons dit, de petits cristallisoirs en verre de Bohême, disposés par paire de telle façon qu'un cristallisoir recouvre l'autre, et que les deux constituent une sorte de *boîte*, véritable réduction de la grande cloche de Koch. Nos figures 7 et 7 *bis* montrent l'appareil.

Les boîtes de Petri se stérilisent au four Pasteur ou mieux encore à l'autoclave.

Quant le moment est venu de s'en servir, on soulève aussi peu que possible le *couvercle* de la boîte, et on verse dans le cristallisoir inférieur le tube de gélatine qui contient la dilution de semence à répartir. On remplace le couvercle et on agite doucement de façon à répartir également le milieu de culture.

La gélatine *prise*, les boîtes de Petri peuvent être laissées ensuite à la température du laboratoire, ou mises à l'étuve à 18-22°.

On pourra avec avantage si l'on craint la dessiccation de la gélatine qui en effet se produit dans ce procédé, mettre les boîtes de Petri dans une *chambre humide* de Koch (Voy. ci-dessus).

Tel est ce petit appareil de toute simplicité, dont la manœuvre est aisée, et qu'on doit recommander entre tous pour la culture en plaques.

L'examen de la gélatine étalée, le prélèvement des colonies s'y font de la même façon que sur les plaques de Koch.

Culture en plaques sur gélose.

Nous décrivons : 1° La méthode ordinaire qui s'applique à la séparation des germes, à l'étude des formes de leurs colonies dans la gélose.

2° La méthode de séparation de certains microbes, méthode qui, nous l'avons dit, est applicable à la gélose comme au sérum, mais a surtout été pratiquée avec le sérum (Roux et Yersin).

1° Employez les boîtes de Petri, à l'exclusion de tout autre appareil. Versez « dans une boîte de Petri stérilisée le contenu d'un tube de gélose stérile que l'on a préalablement liquéfiée sur la flamme du gaz, ou au bain-marie; on laisse la gélose faire prise, dans la plaque, par refroidissement, à l'abri de l'air.

» On fait alors, avec l'anse de platine chargée des microbes que l'on désire séparer, 6 ou 7 stries à la surface du milieu nutritif. Ces stries, que l'on peut disposer de façon qu'elles forment un quadrillage, doivent être faites légèrement, en promenant simplement l'aiguille sans la recharger à la surface de la gélose. L'anse de platine se

dépouille des germes au fur et à mesure qu'on l'essuie pour ainsi dire sur la gélose, et les colonies du microbe seront suffisamment espacées pour être isolées ensuite les unes des autres, et pour pouvoir être, par conséquent, prélevées avec pureté.» (R. Würtz.)

2° Prenez 5 à 6 tubes de gélose ou de sérum — la manœuvre est la même — numérotez-les.

Promenez sur la surface inclinée de chacun d'eux successivement, de façon à y faire rapidement quelques stries, le fil de platine chargé de la substance qui contient les germes à isoler. Le fil de platine ne doit pas être rechargé pendant toute la durée de l'opération.

Les premiers tubes contiendront des colonies pressées et peu reconnaissables, les derniers montreront des colonies parfaitement isolées et distinctes, qu'il sera facile d'aller cueillir pour les examiner et les repiquer.

CHAPITRE VI

TECHNIQUE GÉNÉRALE DES CULTURES.

(Suite.)

Les anaérobies.

La culture des anaérobies est d'une haute importance en microbie; il semble pourtant qu'elle soit redoutée de la plupart des élèves. Elle ne présente cependant aucune difficulté majeure. La culture des anaérobies en milieux liquides est des plus simples; la culture sur milieux solides, la séparation des espèces anaérobies sur gélatine ou gélose est plus complexe, mais les tours de main qui permettent de la réaliser s'apprennent bien vite.

Nous donnerons à ce chapitre plus de développement qu'il n'en comportait dans la première édition de ce *Précis*, de façon à permettre à l'élève de faire un choix parmi les divers procédés, et de s'adresser à celui que les moyens à sa disposition lui permettront le mieux de réaliser.

Nous exposerons successivement :

- I. La culture dans les milieux liquides;
- II. La culture dans les milieux solides : gélatine et gélose d'une part, pomme de terre d'autre part;