

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;



III. La séparation des espèces anaérobies par la culture en gélatine ou en gélose.

Quelques généralités sont applicables à tous ces modes de culture : nous devons les exposer d'abord.

Pour entreprendre les cultures dans le vide, il faut disposer :

- a) D'une machine à faire le vide;
- b) D'un gazomètre rempli de gaz inerte.

a) Pour faire le vide, deux appareils sont indiqués :

1) La machine pneumatique à mercure, d'Alvergniat ;

2) La trompe à eau, d'Alvergniat.

1) La machine pneumatique à mercure d'Alvergniat (fig. 47) est un appareil d'une perfection absolue, permettant de pousser le vide jusqu'aux dernières limites. Le seul inconvénient de ce bel appareil est son prix très élevé.

Il convient d'ajouter cependant qu'il existe un modèle simplifié, aujourd'hui d'un usage courant dans les laboratoires de bactériologie, et que ce modèle, beaucoup moins coûteux, suffit amplement à la culture des anaérobies. Notre figure 48 le représente et la légende en décrit suffisamment l'usage.

2) La trompe à eau est d'un prix plus modique, et partout où l'on dispose d'un écoulement d'eau à forte pression, on aura tout avantage à l'adopter. On se rappellera cependant que le vide opéré par cet appareil, représenté figure 49, est moins parfait que le vide fait par la machine pneumatique à mercure, et que le rinçage des milieux de culture avec le gaz inerte s'impose absolument, quand on fait usage de la trompe, tandis qu'il

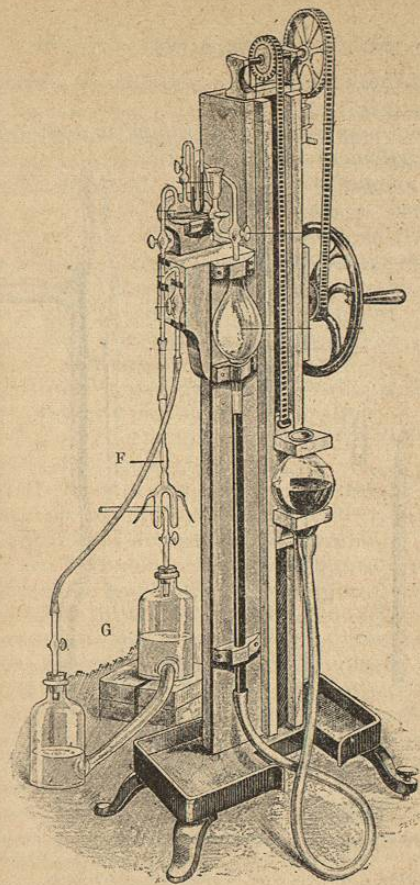


Fig. 47.

Cette figure représente un des grands modèles de la machine d'Alvergniat. Le lecteur se reportera au catalogue de la maison pour tous détails sur l'usage de l'appareil. — F est un tube double de Pasteur. — G est un gazomètre à hydrogène ou à tout autre gaz inerte.



est facultatif quand on emploie la machine pneumatique.

On peut employer soit la trompe en verre qu'on monte facilement soi-même sur un robinet d'eau avec un ajutage en caoutchouc fort, soit la trompe avec garniture métallique qu'on

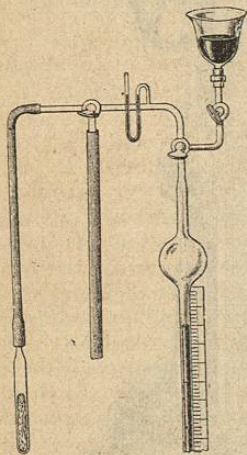


Fig. 48 (\*)

(\*) Cette figure est un schéma du petit modèle d'Alvergniat. On y voit à gauche un tube à vider d'air ; au milieu est un tube de caoutchouc destiné à se relier avec le gazomètre à hydrogène.

trouve communément dans le commerce, ce qui est préférable.

On saura que lorsqu'on fait usage de la trompe

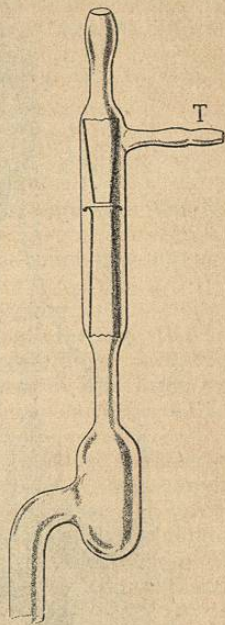


Fig. 49.

montée extemporanément sur un robinet d'eau, l'ajutage en caoutchouc qui fera suite à la branche T dans le montage de l'appareil complet devra recevoir soit un robinet mobile, soit une pince à pression de Morh, destinés l'un ou l'autre à fermer toute communication entre la trompe et le récipient que l'on vide : cette communication doit être fermée en règle la *trompe marchant encore*. Si on arrêta d'abord l'écoulement de la trompe, le vide étant plus parfait dans le récipient qu'on a purgé d'air que dans la trompe, l'eau jaillirait dans ce récipient.

Les trompes avec garniture métallique sont toujours munies d'un robinet de ce genre.

b) Le gaz inerte doit être l'hydrogène, et non l'acide carbonique.

Le gaz est contenu dans un gazomètre à eau, du modèle bien connu dans les laboratoires de chimie. Notre figure 47 représente cet appareil.

Le gaz hydrogène doit être absolument pur. On le fabriquera de préférence avec du zinc pur et de l'acide chlorhydrique ou sulfurique purs ; on le lavera et on le débarrassera, dans une série de flacons laveurs contenant eau, potasse, azotate d'argent et acide sulfurique, des dernières traces d'impuretés qu'il aurait pu entraîner, de telle façon qu'il arrive pur dans le gazomètre. L'eau du gazomètre recevra en outre une solution d'hydrosulfite de soude.

Quelques auteurs font usage du gaz d'éclairage : c'est un procédé simple, mais le gaz d'éclairage ne vaut pas l'hydrogène.

Il est bon de disposer les choses de telle façon que le *récipient* qui contient la culture à purger d'air, la *machine* à faire le vide — trompe à mercure, ou trompe à eau — et le *gazomètre* soient reliés de manière que le récipient com-



munique à volonté soit avec la machine à vide soit avec le gazomètre par un simple jeu de robinet.

La machine d'Alvergnyat se prête admirablement à cette disposition ; on peut y adapter à la fois et le tube d'amenée du gaz inerte et le récipient à vider d'air, et par un jeu de robinets vider le récipient d'air, le remplir de gaz à volonté, enlever ce gaz à son tour, etc., etc. (voy. fig. 47).

Quand on fait usage de la trompe on peut adopter le modèle suivant (fig. 50) ou tout autre analogue :

Soit R un robinet à trois voies faisant communiquer deux à deux : A, le tube relié à la trompe T, tube de vide ;

B, le tube en caoutchouc fort monté sur une des tétines du robinet à trois voies et supportant le récipient qui contient le milieu de culture ;

C, le tube d'amenée du gaz hydrogène.

Sur le trajet du tube A on interposera en un point quelconque F un baromètre ou un indicateur métallique de vide.

Le robinet à trois voies et les tubes mettant ce robinet en communication avec la trompe d'une part, avec le gazomètre d'autre part et tout au moins le premier de ces tubes, seront de préférence en *cuivre*. Les montures en verre sont d'un usage beaucoup moins recommandable.

L'appareil ainsi monté est, somme toute, de prix assez peu élevé.

#### I. — CULTURE DANS LES MILIEUX LIQUIDES

Nous conseillons de pratiquer la culture des anaérobies en milieux liquides dans l'un des appareils suivants :

a) Tube double (en U) de Pasteur ;

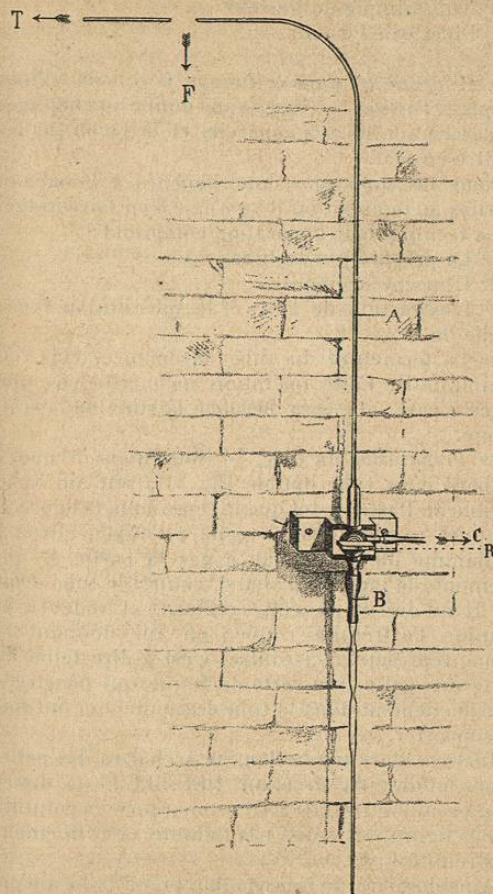


Fig. 50.



- b) Tube simple de Pasteur;  
c) Pipette de Pasteur.

a et b) *Culture dans le tube en U et dans le tube simple de Pasteur.* — Nous avons donné au chapitre 1 la description de ces appareils et la façon de les mettre en état.

Nous les supposons donc bouchés à l'ouate et stériles au moment où il va s'agir d'en faire usage.

La technique de l'opération comprend :

- 1° La préparation du tube;
- 2° L'ensemencement;
- 3° L'extraction de l'air, et la substitution éventuelle de H;
- 4° La fermeture du tube ensemencé, vide, ou rempli de H. Cette opération ne mérite pas une place à part; elle sera décrite à la suite de la troisième.

1° *Préparation du tube.* — Nous nous occupons d'abord d'un tube double (fig 34). Sur un tube double de Pasteur, tel que le représente la figure 9, chapitre 1, stérilisé et bouché à l'ouate, étirez à la flamme du chalumeau à gaz la partie B qui surmonte le tampon d'ouate; coupez le tube droit en H au-dessus de cette effilure, et rondez à la flamme l'extrémité coupée en lui donnant la forme représentée ci-contre, c'est-à-dire faites de cette extrémité une sorte de tétine qui pénétrera plus facilement dans le tube de caoutchouc qui doit la supporter.

Donnez alors sur la flamme à chacun des petits tubes latéraux la direction DEF, D'E'F' (la direction première DEG, D'E'G' est marquée en pointillé sur la figure), et étirez à la flamme assez finement l'extrémité F, F'.

Ainsi préparé, le tube double prend la forme ci-contre (fig. 51).

La préparation d'un tube simple est exactement la même, et ce tube prend la forme de la figure 52.

2° *Ensemencement.* — Portez la semence, quelle qu'elle soit, quelle que soit sa provenance, dans le bouillon stérile d'un matras Pasteur.

Coupez alors l'extrémité effilée F d'un des petits

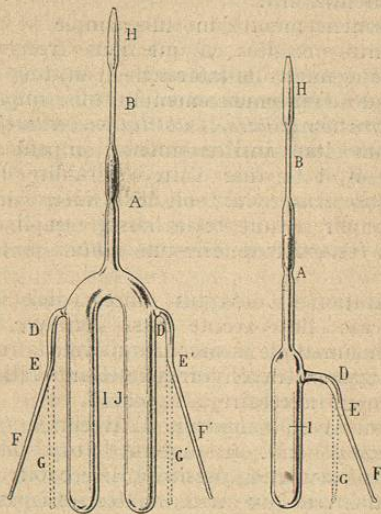


Fig. 51.

Fig. 52.

tubes latéraux, flambez sa surface extérieure, et laissez refroidir. Introduisez l'effilure F dans le matras, et aspirez par l'extrémité H le bouillon ensemencé dans la branche I du tube. Retirez l'effilure quand vous jugez la quantité de liquide suffisante dans la branche I, soufflez par H de façon à expulser le liquide qui reste dans F, et flambez fortement



la surface de cette effilure. Fermez alors l'extrémité de F sur la lampe à alcool.

Emplissez par une manœuvre identique la branche J par l'effilure F' d'un bouillon *non ensemené* qui servira de *témoin*, ou qui pourra plus tard à son tour être ensemené par une goutte de la culture contenue en I.

L'ensemencement d'un tube simple se fait par les mêmes procédés: ce que nous avons dit de l'ensemencement de la branche I du tube double s'applique à l'ensemencement du tube simple.

3° *Extraction de l'air, et substitution éventuelle de H.*

— Le tube étant ainsi ensemené, on peut se proposer: soit de le vider d'air, c'est-à-dire de faire une *culture dans le vide*; soit de le vider d'air, mais de le remplir ensuite et le laisser rempli de gaz inerte, c'est-à-dire de faire une *culture dans le gaz inerte*.

L'opération est des plus simples dans l'un et l'autre cas; elle s'exécute aussi bien avec la machine pneumatique à mercure qu'avec la trompe à eau, un gazomètre à hydrogène étant d'ailleurs le complément nécessaire à l'appareil.

Veut-on avec la machine d'Alvergniat faire la *culture dans le vide*, on suspend le tube simple ou double au caoutchouc destiné à le recevoir, et, par des manœuvres que nous ne décrirons pas, on y fait le vide. Il n'est pas nécessaire, mais il n'est pas mauvais, de rincer une fois ou deux le tube vidé d'air avec du gaz hydrogène qu'on extrait ensuite. Le vide étant fait on fond le tube en B avec une flamme de gaz, on le ferme sous le vide en le séparant de la machine et on porte dans l'étuve à + 37°.

Pendant les manœuvres de vide « au moyen d'une petite flamme à gaz, appliquée avec précaution, on détermine l'ébullition à basse température

dans les deux branches (ou la branche unique) pour bien chasser tout l'air. Les bulles produites viennent crever sur les parois du tube légèrement chauffé dans sa partie supérieure. » (Roux.)

Quand on fait usage de la trompe, on suspend par le moyen d'un caoutchouc épais au robinet à trois voies qui communique d'autre part avec la trompe et avec le gazomètre, le tube simple ou double (fig. 49).

On ouvre alors la communication avec la trompe; le vide s'opère. Pendant les manœuvres du vide il faut, ici, comme dans le cas précédent, au moyen d'une petite flamme de gaz, déterminer l'ébullition dans les deux branches ou la branche unique du tube, et d'autre part chauffer la paroi du ou des tubes dans leur partie supérieure de façon que les bulles de gaz viennent crever au contact de cette paroi, et que le liquide ne soit pas entraîné avec elles dans la partie effilée du tube vers le bouchon d'ouate.

Le vide étant partiellement fait, remplissez à deux ou trois reprises le tube de gaz hydrogène que vous extrairez chaque fois à l'aide de la trompe, et après la dernière opération, le tube étant complètement privé d'air, fermez-le en fondant à la flamme du gaz le verre au niveau de l'étranglement B, au-dessus du tampon d'ouate.

Portez le tube de culture à l'étuve.

La *culture dans le gaz inerte* à l'aide de la machine pneumatique à mercure s'effectue de la façon suivante:

Reliez le tube double ou simple à la machine pneumatique à mercure, comme il a été dit ci-dessus. Faites le vide. Faites passer une première fois l'hydrogène dans le tube, extrayez le gaz; remplissez alors une fois encore avec H, et fermez le tube en B *sous le courant de gaz*.



Portez la culture dans l'étuve.

L'opération avec la *trompe* diffère peu : le vide étant fait dans le tube simple ou double, faites-y passer à plusieurs reprises l'hydrogène pour chasser les dernières traces d'air ; remplissez une dernière fois avec H, et, le gaz passant toujours, fermez à la flamme le tube, qui restera ainsi rempli du gaz inerte.

Portez le tube à l'étuve.

« Pour faire une prise du liquide contenu dans l'intérieur du tube (simple ou double) sans introduire d'impureté dans la culture, il faut casser le tube effilé B au-dessus du tampon d'ouate, laisser rentrer l'air (1) et incliner le tube pour faire sortir un peu du liquide par l'effilure latérale préalablement ouverte et passée dans la flamme. L'introduction de l'air arrête la culture. Si on veut qu'elle continue, il faut ouvrir le tube de façon qu'il se remplisse du gaz inerte. Pour cela, après avoir fait un trait à l'extrémité du tube B, on l'adapte à un tube de caoutchouc relié au gazomètre, on casse la pointe dans le tube de caoutchouc, et le gaz remplit l'appareil. » (Roux.)

c) *Culture dans les pipettes Pasteur.* — Nous employons depuis longtemps ce procédé de toute simplicité qui donne les meilleurs résultats, et a l'avantage d'être de facile exécution et de n'exiger d'autre appareil qu'une simple pipette qu'on peut confectionner soi-même.

Prenez un tube de verre fort et de diamètre supérieur à celui qui sert communément à fabriquer les petites pipettes. Les tubes que nous employons ont 10 millimètres de diamètre.

Opérez tout d'abord comme pour fabriquer une pipette ; vous obtiendrez la forme connue déjà représentée figure 13.

(1) L'air rentrant filtre sur le tampon d'ouate.

Faites alors un étranglement court en B, poussez l'ouate jusqu'à l'étranglement, et achevez en pratiquant au-dessous de l'ouate en C un étranglement tel qu'il puisse être facilement fondu à la flamme de gaz ou d'alcool, puis en bordant l'extrémité H de telle façon qu'elle forme tétine pour s'adapter plus facilement au caoutchouc de la conduite de vide.

Vous avez en résumé alors l'appareil représenté (fig. 33). Il est bien entendu que l'extrémité effilée est fermée.

Portez l'appareil terminé dans le four à flamber. Après stérilisation il est prêt pour l'usage.

Voici comment l'opération doit être conduite avec ces tubes : Un matras Pasteur rempli de bouillon stérile vient de recevoir la semence destinée à pousser dans le vide ou dans un gaz inerte.

Passez l'effilure de votre pipette dans la flamme, brisez-en la pointe, coudez légèrement l'effilure, plongez-la dans le matras ouvert suivant les règles posées au chap. iv et aspirez par H le liquide ensemené que vous ferez ainsi passer dans le corps de votre pipette.

Il n'est pas bon que le liquide monte jusqu'à l'étranglement B : n'emplissez le corps de la pipette qu'aux deux tiers. Retirez l'effilure, fermez-la à la lampe aussi près que possible du corps de la pipette.

Il suffira dès lors d'adapter H à la machine pneumatique d'Alvergnat ou à la trompe pour que les opérations de culture dans le vide, de culture dans l'hydrogène se fassent exactement comme avec le tube simple



Fig. 33.