

de Pasteur. Tout se passe absolument comme ce que nous avons décrit ci-dessus.

L'opération terminée on fond C à la flamme de gaz; on ferme le tube en cet endroit, on le sépare de la machine à vide et on porte à l'étuve le tube qui a pris la forme ci-contre (fig. 54).



Fig. 54.

Veut-on faire une prise dans la culture, rien de plus simple : ouvrez en C par un trait de lime — si le tube était vide, l'air ne rentrerait qu'en filtrant sur l'ouate. — Faites alors un trait sur le verre au niveau du milieu du tampon d'ouate, complétez la section avec le charbon de Berzélius ou une pointe de verre rougie à la flamme du chalumeau, et détachez la rondelle de verre ainsi sectionnée.

Rien ne sera plus facile que d'aller puiser dans la culture avec une pipette ordinaire, en prenant toutes les précautions requises et indiquées dans nos chapitres précédents : stérilisation de l'effilure de la pipette aspirante, flamage de la pipette qui contient le liquide au niveau de son ouverture, rebouchage immédiat avec l'ouate, flamage de l'ouate et des parois à son niveau, etc.

La culture, une fois la pipette ouverte, ne pousse plus, mais elle peut se garder sans crainte de contamination. On peut au besoin fermer au-dessous de l'ouate en B, et conserver alors indéfiniment dans le petit tube clos de toutes parts.

Pour pratiquer de *grandes cultures* d'anaérobies, il faut avoir recours à une autre technique et les appareils suivants permettront facilement d'atteindre le but :

On peut faire construire un ballon à parois capables de résister à la pression atmosphérique. Ce ballon sera muni d'une tubulure latérale et d'une tubulure supérieure. Il aura, sauf la forme du récipient, la figure d'un *tube simple* de Pasteur et sera traité de tous points comme on traite cet appareil.

M. R. Würtz a donné la description d'un appareil simple, d'exécution facile et qui nous paraît aussi remplir le but cherché (fig. 55) :

« C'est, dit-il, un flacon d'un litre, à gros col fermé par un bouchon en caoutchouc à deux trous.

» Dans ce bouchon passent deux tubes en verre : l'un

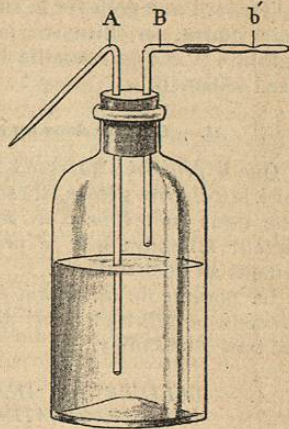


Fig. 55.

A va jusqu'au fond du flacon, l'autre jusqu'au col seulement. Ils sont recourbés tous deux. Le tube A se termine par une effilure mince. Le tube B porte deux étranglements, l'un au sommet de la courbure, l'autre près de son orifice libre B. Tous deux sont garnis d'ouate.

» Pour se servir de cet appareil on le remplit de bouillon à moitié ou aux deux tiers, et on le stérilise à l'autoclave à 115° pendant quinze minutes. Quand il est froid on ensemence son contenu en flambant l'effilure A que l'on casse, et que l'on plonge dans le tube de culture dont on veut semer

une trace. On aspire quelques gouttes, on ferme l'effilure à la lampe *et on fait le vide dans le flacon*. Avant de fermer l'effilure, on fera barboter de l'hydrogène de A en B. On ferme B au point b', à la lampe, et on porte le flacon ainsi ensemencé à l'étuve. Pour prélever la culture, on ouvre en b', l'air rentre, se filtre sur la bourre B; on ouvre l'effilure A et l'on recueille la culture en soufflant par l'orifice B. »

II. — Culture dans les milieux solides.

Que le procédé s'adresse à la gélatine, à la gélose ou à la gélatine gélose, il est identique. Lors donc que nous traiterons d'un seul de ces milieux, le lecteur entendra que le procédé s'applique également aux deux autres.

La pomme de terre doit être traitée à part, le procédé de culture à l'abri de l'air qu'elle réclame est tout particulier.

A. — CULTURE DES ANAÉROBIES DANS LA GÉLATINE.

1. Voici d'abord un procédé qui n'exige ni appareil à vide, ni gaz inerte : il est fondé sur l'addition aux milieux nutritifs de substances facilement oxydables, et favorisant par cela même le développement des anaérobies semés dans ces milieux.

« Kitasato et Weil ont fait des recherches sur les substances oxydables qu'on peut ainsi utiliser, et recommandent deux préparations :

« 1° Gélose nutritive ordinaire — ou gélatine — additionnée de 0,3 ou 0,5 p. 100 de *formiate de soude*.

« 2° Même substance nutritive, additionnée de 0,1 p. 100 de sulfo-indigotate de soude. » (Salomonsen.)

L'addition de 2 p. 100 de glucose (Liborius) favorise par le même mécanisme le développement des anaérobies.

Emplissez donc des tubes à essai du milieu nutritif ainsi préparé « jusqu'à 5 centimètres de l'orifice du tube, de manière que la colonne *bleu foncé* de gélose ait 10 centimètres de haut. On devra ensemencer avec une aiguille de platine très longue, de façon à porter la culture le plus loin possible du contact de l'air. Avant de reboucher le tube, on y versera pour plus de sûreté, avec une pipette, une *couche de 1 centimètre de haut de pétrole ou d'huile stérilisés*. On rebouche le tube et on le met à l'étuve à + 37° (s'il s'agit de gélose). Souvent au bout de douze heures déjà il se produit des gaz abondants qui peuvent parfois projeter le bouchon hors du tube. En tous cas, on observe une décoloration du tube : la glucose et le sulfo-indigotate s'oxydant facilement sous l'influence du développement des microbes, s'emparent de l'oxygène dissous ou contenu dans le tube : ce tube, qui était bleu noir avant l'ensemencement, devient jaune foncé : l'indigo bleu passe à l'état d'indigo blanc. » (R. Würtz.)

2. M. Würtz a imaginé un procédé de facile exécution, basé sur l'ébullition du milieu nutritif sous un courant de gaz inerte (M. Würtz emploie le gaz d'éclairage toujours à portée dans les laboratoires). Quand l'air est chassé du milieu nutritif, on verse sur le milieu une couche d'un liquide *isolant*, pétrole ou huile. On laisse refroidir, et on ensemence sous un courant de gaz.

Voici la description que M. Würtz donne de son procédé :

« On prend un tube de gélose sucrée à 2 p. 100 ou de gélose ordinaire — ou de gélatine — et on le fixe verticalement à l'aide d'un support et d'une

pince. On remplace le tampon d'ouate par un bouchon de caoutchouc muni de deux tubes de verre A et B. Le tube A qui doit à son extrémité inférieure effleurer le milieu nutritif est embranché sur un tuyau de caoutchouc relié à un bec de gaz d'éclairage. On fait passer le courant de gaz cinq minutes, et pendant ce temps on fait bouillir la gélatine à l'aide d'un bec Bunsen. Pendant tout le temps que le gaz d'éclairage passe dans le tube, il ne peut s'en dissoudre dans la gélose qui est en ébullition. Au bout de quatre à cinq minutes, on verse immédiatement par le petit entonnoir B qu'il est facile de faire soi-même — en effilant un tube à essai — 1 ou 2 centimètres cubes de pétrole *stérilisé*.» On laisse alors le milieu faire prise par le refroidissement. « On enlève ensuite le bouchon de caoutchouc, et on le remplace

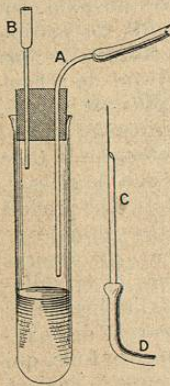


Fig. 56.

ordinaire. Pour ensemer, on incline le tube de façon à mettre à nu la moitié de la surface de la gélose, et on fait la piqûre au moyen d'un fil de platine *monté sur la paroi d'un tube de verre*, en rapport lui-même par le tuyau D avec une conduite de gaz qui reste ouverte pendant tout le temps de l'opération.»

Le procédé de M. R. Würtz donne d'excellents résultats, nous avons pu nous en assurer maintes fois.

M. Roux a donné la description de deux procédés rigoureux pour culture des anaérobies dans les milieux solides.

L'un de ces procédés (3) est basé sur le barbotage de gaz inerte dans le milieu nutritif de façon à chasser absolument toute trace d'oxygène. Le deuxième (4) plus complexe est basé sur la production du vide dans le milieu et l'ensemencement dans un courant de gaz inerte.

Nous empruntons à M. Roux la description de ces deux procédés :

3. La gélatine nutritive est contenue dans un tube à essai, étiré à sa partie supérieure en un tube assez mince pour qu'il soit facilement fermé au chalumeau, et fermé par un tampon de coton.

« Lorsque la gélatine a été liquéfiée dans un bain d'eau chaude, on fait pénétrer par l'orifice supérieur un tube de petit calibre qui ne ferme pas complètement l'ouverture et qui amène un courant de gaz inerte privé d'air. Le tube adducteur du gaz a été soigneusement *stérilisé* et il porte un tampon de coton qui arrête les impuretés que pourrait entraîner le courant gazeux. L'appareil est ainsi promptement privé d'air. On soulève alors le tube adducteur au-dessus du niveau de la gélatine, qu'on rend solide en la refroidissant. Le courant de gaz continue d'empêcher l'introduction de l'air extérieur; soulevant le coton qui ferme l'orifice du tube, on introduit un fil de platine chargé de la semence, et on pratique la piqûre dans la gélatine. Le tube adducteur est alors soulevé jusque dans le haut du tube que l'on ferme à l'étranglement avec le chalumeau. On évite complètement l'intro-



Fig. 57.

duction de l'air » (Roux, *Annales Pasteur*, I, p. 55).

La figure ci-jointe montre un détail de l'opération : l'adduction du gaz inerte. On voit que le tube adducteur est une pipette ordinaire, coudée au niveau de l'effilure (ou tout aussi bien au-dessus). Il est nécessaire que cette pipette soit de fort diamètre, de telle façon que l'effilure en soit résistante et ne soit pas exposée à casser pendant les manœuvres de l'opération. Des tubes de dix millimètres de diamètre environ seront avantageux.

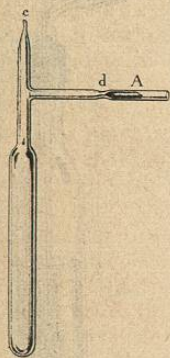


Fig. 58.

4. La culture dans ce procédé se pratique avec le tube figuré au chapitre I (fig. 11).

Le tube ayant été stérilisé au four, on l'emplit de gélatine stérile jusqu'au quart inférieur environ avec un *entonnoir capillaire*. On replace le tampon d'ouate sur la tubulure supérieure et on stérilise à l'autoclave.

L'appareil est prêt à servir.

Pour y pratiquer une culture anaérobie, fermez la tubulure B en *c* au-dessous de l'ouate, faites sur A un étranglement en *d*, poussez l'ouate jusqu'à cet étranglement, et étranglez encore au-dessus, de telle façon que le coton soit immobilisé. Le tube prend alors la figure ci-jointe (fig. 58).

Fondez la gélatine à une température aussi basse que possible, et adaptez A à la machine pneumatique ou à la trompe. « A deux ou trois reprises on rince l'appareil avec le gaz inerte du gazomètre, ainsi que nous l'avons expliqué plus haut. Les projections de la gélatine sont facilement évitées, soit en chauffant avec une légère flamme la paroi

du tube dans la partie supérieure, soit en laissant rentrer le gaz si l'ébullition devient trop tumultueuse : c'est là un jeu de robinets facile à comprendre. L'appareil étant privé d'air, on le laisse refroidir en le maintenant en communication avec le gazomètre. Lorsque la gélatine a fait prise, on soulève le flacon à eau du gazomètre, de façon à produire une légère pression dans l'intérieur du tube. Avec un couteau à couper le verre, on fait un trait sur la portion effilée *c*, et après l'avoir chauffée, on la casse avec une pince flambée : le gaz s'échappe, empêchant l'introduction de l'air. Par l'orifice on fait pénétrer le fil de platine, ou une tige de verre avec laquelle on fait la piqure. On ferme ensuite à la flamme. Il est facile de conserver le tube plein de gaz, ou de le vider, si on veut ensuite étudier le gaz que dégagera la culture de l'organisme anaérobie. L'appareil est détaché par un trait au chalumeau sur la partie étranglée *d*. » (Roux, *Annales Pasteur*, I.)

5. M Roux a indiqué un bien élégant procédé de culture en milieu solide, procédé qui met à profit la propriété d'absorber l'oxygène de l'air que certains microbes, tels que le *bacillus subtilis*, ont à un haut degré.

« Semons du *bacillus subtilis* dans un tube contenant du bouillon de veau neutre, teinté par une goutte de solution d'indigo bleu, et fermons le tube à la lampe. Le *bacillus subtilis* va former un voile à la surface, et bientôt il aura absorbé l'oxygène libre contenu dans le liquide et l'espace clos du tube. Il réduira ensuite l'indigo, le transformera en indigo blanc : la décoloration du liquide indiquera qu'il n'y a plus du tout d'oxygène libre dans le tube. Même si on laisse le tube ouvert, le *bacillus subtilis* s'oppose au passage à l'air, et le liquide reste incolore dans le fond.

» Pour utiliser cette propriété du bacillus subtilis on peut opérer comme il suit : On liquéfie par la chaleur la gélatine ou la gélose contenue dans un tube à essai ordinaire, on la porte à l'ébullition pour chasser tout l'air, puis on la solidifie rapidement en plongeant le tube dans l'eau froide. Au moyen d'un fil de platine, on pratique la piqûre comme à l'ordinaire, et on fait tomber au-dessus de la surface de la gélatine un peu de gélose liquéfiée.

» Quand le bouchon de gélose est solide, on introduit dans le tube une culture de bacillus subtilis dans du bouillon, et on ferme l'extrémité à la lampe. Le bacillus subtilis forme promptement un voile à la surface, prend tout l'oxygène contenu dans le tube, et au-dessous l'organisme anaérobie pousse parfaitement à l'abri, séparé par le bouchon de gélose qui ne se liquéfie pas. Il se dégage des gaz qui se diffusent dans la gélatine et y creusent des vacuoles. Ce tour de main très simple donne de bons résultats. Pour faire ensuite une prise de semence sans prendre en même temps du bacillus subtilis, on lave extérieurement le tube; vers le milieu de la culture on fait sur le verre un trait à la lime; avec le charbon de Berzélius on détache la partie inférieure du tube, et on peut puiser facilement et avec pureté le microbe anaérobie.»

B. — CULTURES DES ANAÉROBIES SUR LA POMME DE TERRE.

Cette méthode est encore due à Roux :

« On soude au tube, que nous avons décrit ailleurs pour la culture sur pomme de terre en présence de l'air, au-dessous de l'étranglement, un tube latéral, étiré en *a* (voy. fig. 59), et muni d'un tampon de coton.

» Après avoir introduit la tranche de pomme de terre dans le tube, on stérilise le tout à l'autoclave, comme il a été dit plus haut, puis, quand la surface de la pomme de terre est égouttée, on sème l'organisme anaérobie que l'on veut cultiver, et on ferme à la lampe la partie supérieure du tube comme on le voit. La tubulure latérale est

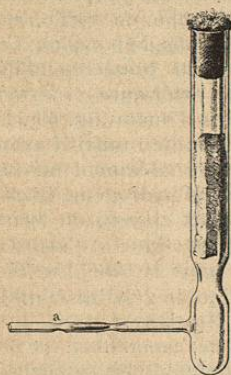


Fig. 59.



Fig. 59 bis.

reliée à la pompe à mercure et on fait soigneusement le vide. La tranche de pomme de terre est maintenue pendant quelques instants sous le vide de la machine pour que l'air qu'elle contient s'échappe, puis avec un trait de chalumeau porté en *a*, on détache le tube. Il est facile de suivre à travers la paroi du verre le progrès de la culture (fig. 59 bis).

» Au lieu de faire le vide, on pourrait, après avoir étiré la partie supérieure du tube, faire passer un courant de gaz privé d'oxygène, et fermer ensuite à la lampe le tube en haut et en bas.» (Roux, *Annales Pasteur*, t. II, p. 30.)

III. — Séparation des microbes anaérobies dans les milieux solides.

a) *Méthode de Fränkel.* — La méthode de Fränkel est assez simple. « Il se sert d'un simple tube à essai, fermé par un bouchon de caoutchouc par lequel passent deux tubes coudés, un tube d'arrivée, qui s'enfonce jusqu'au fond du tube, et un tube de sortie, qui commence au-dessous du bouchon. Ces deux tubes sont au préalable effilés dans leur partie extérieure et fermés avec des tampons d'ouate (fig. 60). Le tube à essai et le milieu nutritif ayant été stérilisés convenablement on fait passer un courant d'hydrogène. Quand l'air est tout à fait chassé, on ferme à la lampe en leurs effilures, d'abord le tube de sortie, puis le tube d'entrée, et on étend le liquide gélatinisé sur la paroi du tube. » (Duclaux.)

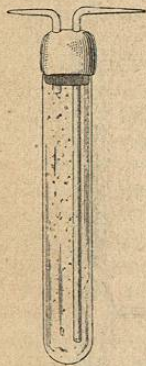


Fig. 60.

Le bouchon de caoutchouc et les tubes de verre doivent être soigneusement stérilisés. Pour éviter la diffusibilité de l'hydrogène qu'on est toujours exposé à voir remplacé par de l'air, Fränkel recommande de couvrir le bouchon et l'extrémité du tube de paraffine.

b) *Méthode de Vignal.* — M. Vignal a exposé dans les *Annales Pasteur* (t. I, p. 398) une méthode simple et qui peut rendre des services.

« Je me sers, dit-il, de tubes de verre d'un diamètre intérieur de 3 à 4 millimètres et longs de 1 mètre. Je les effile à une extrémité, à l'autre je pratique un étranglement, et je les bouche par un tampon de coton. Puis je stérilise, soit direc-

tement à la flamme, soit en chauffant dans un tube de cuivre jusqu'à roussir le coton.

» Je fais bouillir d'un autre côté dans un tube à essai de la gélatine nutritive, je la laisse refroidir dans un courant d'hydrogène, je l'ensemence en présence de ce gaz, au voisinage de 25°, et quand une agitation convenable a uniformément réparti les germes, j'aspire la gélatine dans le tube de verre par la pointe effilée; je referme les deux extrémités et j'abandonne le tube à lui-même...

» Les anaérobies se développent en petites colonies qui, si les germes ont été assez dilués, sont parfaitement isolées les unes des autres.

» Pour isoler les microbes de ces diverses colonies, on coupe à un niveau voulu le tube de verre, après l'avoir lavé au bichlorure de mercure et à l'alcool absolu, et séché avec du papier stérilisé, et l'on fait la prise à l'aide d'un fil de platine.»

c) *Méthodes de M. Roux.* — Ce sont les méthodes d'élection : elles présentent une rigueur absolue.

Elles comprennent deux procédés : dans l'un intervient une manœuvre de vide ; l'autre ne comporte que le barbotage d'un gaz inerte dans le milieu nutritif.

1. On prend un tube de verre fermé, large de 3 centimètres environ, long de 25 à 30 centimètres, et terminé par un tube plus étroit obturé par un tampon de coton (voy. fig. 45). Ce tube contient un peu de gélatine stérilisée : on fond la gélatine, et on introduit avec les précautions ordinaires une quantité de semence convenable pour avoir des colonies séparées. En ensemençant plusieurs tubes



Fig. 61.

avec des quantités de semence de plus en plus petites, on arrive toujours à une séparation parfaite des colonies. On étrangle le tube à la lampe (fig. 62) un peu au-dessus de la partie renflée en *e*. On pousse le coton obturateur jusqu'à cet étranglement, et on étire le tube en A. L'appareil ainsi disposé est mis en communication avec la machine à vide, et il est purgé d'air comme nous l'avons



Fig. 62.

déjà expliqué. On le sépare en le fondant au chalumeau en A, et on le couche sur un plan horizontal. La gélatine s'étale sur la paroi inférieure. Elle fait prise et, comme la couche est très mince on pourra examiner à travers la paroi du verre la forme des colonies. Pour puiser dans l'une d'elles, on ouvre la pointe effilée, on fait rentrer de l'air ou du gaz inerte qui est filtré sur le coton *c*; on coupe le verre en *e*, et avec un long fil de platine ou une tige de verre un peu recourbée à l'extrémité, on peut atteindre la colonie que l'on veut ensemençer. Si les microbes liquéfient la gélatine, et que l'on ne puisse pas renverser le tube pour l'examen au microscope, on fait en *d* un trait avec un couteau à verre, puis avec un charbon de Berzélius on complète la section du tube. Par l'ouverture on pourra introduire un diamant monté sur une tige rigide, et faire un trait intérieur sur chaque paroi du tube; on détachera facilement la gouttière supérieure, et la gouttière inférieure pourra être examinée sous le microscope à la façon d'une plaque ordinaire.

2. « On peut éviter l'emploi d'une machine aspirante, et chasser l'air du tube par un courant de gaz inerte. » Pour cela le tube (fig. 12) décrit au

chapitre II est d'un usage commode. Le tube A est rempli (avec un petit entonnoir capillaire) de gélatine stérile qu'on ensemençer et qu'on maintient liquide. On étrangle B et B, en *dd'*, on pousse le coton jusqu'à ces étranglements, et au-dessus du coton on effile en *mm'*. Le tube B est alors relié



Fig. 63.

au flacon à acide carbonique du gazomètre, on fait barboter le gaz inerte dans la gélatine, il ressort par B'. Lorsque l'appareil est bien purgé d'air, on laisse la gélatine faire prise sous le courant du gaz et s'étaler sur la paroi inférieure de A, et on ferme *m'* puis *m*.