

CHAPITRE II

MILIEUX DE CULTURE

RÉCOLTE, FABRICATION, STÉRILISATION, RÉPARTITION, CONSERVATION

Toute la science bactériologique repose sur l'emploi des *cultures microbiennes*. Constater indéfiniment la présence de microorganismes dans l'air, l'eau, les liquides organiques, etc., n'aurait pas entraîné de grandes découvertes. Le microbe est une algue; il végète, il pullule dans un milieu nutritif approprié¹, si celui-ci est *ensemencé*, c'est-à-dire reçoit un échantillon du microbe à cultiver. Les termes de *terrain*, *semence*, *culture*, *végétation* sont donc parfaitement justes. Si la culture est *pure*, ne contient qu'une seule espèce microbienne, qui a donc été *isolée*, l'étude des propriétés pathogènes du microbe (*inocula-*

¹ Le microbe a besoin, comme toute cellule vivante, d'*aliments* pour végéter. Il lui faut du *carbone*, de l'*oxygène* et de l'*hydrogène* pour fabriquer les produits ternaires qui composent une grande partie de la masse cellulaire : cellulose, sucres, amylacés; il lui faut de l'eau. Le corps microbien contient des matières albuminoïdes; il a donc besoin d'*azote*, sans parler du soufre et du phosphore. C'est ce besoin d'azote qui nécessite la présence de matières *albuminoïdes* dans les milieux de culture et rend par là leur composition si complexe. L'azote des sels ammoniacaux tels que le lactate ou le tartrate d'ammoniaque est difficilement assimilable par les microbes; il en est de même de l'azote de l'urée ou des nitrates qui exigent la présence de matières albuminoïdes. Trouver un aliment simple capable de fournir l'azote aux microbes est le problème actuel (voyez p. 81). Le carbone sera emprunté aux aliments ternaires, c'est-à-dire à des substances organiques précédemment élaborées, car le microbe, *privé*

tion) devient possible. Seulement alors, on peut rechercher quelle a été l'influence du microbe sur le terrain où il a végété (*modification des substances nutritives, fabrication des toxines, des ferments solubles, etc.*), et aussi l'influence du milieu sur les propriétés biologiques du microbe. Il n'y a pas d'expérience possible, avec les microbes, sans cultures pures.

C'est PASTEUR qui a fondé la bactériologie en créant la méthode des cultures, dans ses belles recherches sur la fermentation lactique (1857) et les organismes en suspension dans l'atmosphère (1861). Les premiers milieux employés par PASTEUR et ses élèves étaient *liquides* : solutions minérales, infusions végétales, infusions animales (bouillons), liquides organiques naturels (urine, humeur aqueuse, etc.). Les cultures en milieux liquides forment encore la base de l'expérimentation microbienne, surtout depuis la part prépondérante prise pendant ces dix dernières années par l'étude des *produits solubles* sécrétés par les microbes.

En 1881, KOCH introduisit en bactériologie la méthode des cultures sur *milieux solides*, méthode précieuse qui a ses indications spéciales à côté de la méthode pastorienne. Les travaux de KOCH eurent pour point de départ les observations antérieures d'HOFFMANN (1869) et de SCHROETER (1872). Lorsqu'on laisse exposée à l'air la surface d'une pomme de terre cuite, cette surface se recouvre de taches dues au développement de moisissures ou de microbes. Chaque tache est formée par la réunion d'éléments d'une espèce unique; les champignons, les microbes, tombés de l'atmosphère, ont pullulé sur place, ayant trouvé un milieu nutritif favorable. On comprend de suite l'énorme avantage de pareilles cultures pour l'isolement des

de chlorophylle, ne peut l'emprunter à l'air. Peut-être les microbes qui sécrètent des pigments peuvent-ils assimiler directement le carbone de l'acide carbonique de l'air, sous l'influence de la lumière.

Enfin, le microbe a besoin d'*éléments minéraux* qu'on retrouve dans ses cendres : soufre, phosphore, potassium, calcium, fer, etc.

Voir, pour l'emploi des aliments par les microbes en culture, les travaux d'ARNAUD et CHARRIN, *Transformation et élaboration de la matière organique par le Bacille pyocyanique dans un milieu de culture déterminé*. Acad. des Sciences, 6 avril et 19 mai 1891.

espèces bactériennes et l'examen microscopique des colonies. Le mot « colonie » a été conservé, et désigne un amas microbien isolé, ayant végété sur un milieu solide. Koch songea de suite à solidifier les milieux nutritifs liquides les plus utilisés; il gélatinisa le bouillon. C'était créer un milieu solide très nutritif, de composition variable à volonté, très transparent, permettant l'étude des colonies. La gélatine fondant à + 22° environ, Koch solidifia aussi le bouillon avec une autre substance gélatinisante, l'*agar-agar*, qui résiste aux températures employées dans les laboratoires; il gélifia aussi le *sérum sanguin*. On voit de quelle importance fut l'œuvre de Koch, puisque la gélatine, la gélose (*agar-agar*), le sérum, la pomme de terre sont des milieux couramment employés dans tous les laboratoires, à côté des bouillons Pasteur.

Parmi les milieux nutritifs liquides ou solides, les uns sont naturels (sérum, urine, humeur aqueuse, pomme de terre, œufs, etc.), les autres sont artificiels (bouillon, gélatine, gélose, etc.). La fabrication des milieux artificiels a une importance capitale. Les meilleurs milieux sont constitués par des bouillons, c'est-à-dire par des infusions animales, mais ils ont le grave défaut d'avoir une composition très complexe et très variable. On comprend dès lors la difficulté qu'on éprouve à faire des cultures toujours identiques à elles-mêmes, à savoir quelles modifications a subi le milieu de culture, quels sont les produits solubles rejetés par celui-ci dans le liquide. Or, ces problèmes sont ceux qui se placent aujourd'hui au premier rang dans les préoccupations du bactériologiste. L'idéal, auquel on doit tendre aujourd'hui, est la possession d'un milieu de culture suffisamment nutritif et de composition simple et connue, d'un milieu fournissant l'azote aux microbes sans contenir de substances albuminoïdes. Le jour de sa découverte verra faire un grand pas à l'étude des substances solubles, et par conséquent à la vaccination, à l'immunisation, etc., pour le plus grand profit de la thérapeutique des maladies infectieuses.

Jusqu'à présent les solutions minérales employées sont trop peu nutritives, leur azote est mal assimilé; la végétation se fait mal ou ne se fait pas.

FERMI (1891), GUINOCHET (1892), ARNAUD et CHARRIN (1892), OUCHINSKY (1893), DUFLOCC (1900), etc., ont essayé de cultiver des microbes pathogènes dans des liquides ne contenant pas de substances albuminoïdes. Nous parlerons de leurs recherches au chapitre XII consacré aux *Produits solubles microbiens*. Contentons-nous de dire que HUGOUNENQ et DOYON (1896) n'ont pas confirmé les conclusions d'OUCHINSKY : la diphtérie, le choléra n'ont pu végéter dans le liquide préconisé par cet auteur.

§ 1. — MILIEUX LIQUIDES

Les milieux liquides employés en bactériologie peuvent être naturels ou artificiels.

A) LIQUIDES NATURELS

Un liquide existant dans la nature est employé sans modifications notables.

1° *Sérum sanguin*. — Le sang de l'animal sain est habituellement privé de microbes. Il suffira donc de le recueillir aseptiquement pour posséder, après rétraction du caillot, un sérum liquide n'ayant pas besoin d'être stérilisé. Tout sérum qu'on sera obligé de stériliser sera presque toujours employé à l'état solide, bien que la stérilisation à + 58° soit possible par la méthode de TYNDALL (voy. p. 48).

Pour recueillir le sérum d'un petit animal (lapin, chien), on dénude la carotide (avec toute l'asepsie désirable); on la lie aussi près que possible de la tête, et on la pince à la base du cou. On coupe en sifflet, avec de fins ciseaux flambés, le segment isolé, aussi près que possible de la ligature, et on introduit par cette ouverture une petite canule en verre ou un petit trocart stérilisé. On enlève la pince et le sang est recueilli dans un flacon d'Erlenmeyer stérilisé. Ce flacon est maintenu incliné (fig. 54) pendant toute la durée de la coagulation. On redresse ensuite le flacon et le sérum s'accumule à côté du caillot; on peut le puiser facilement au bout de quarante-huit

heures avec une pipette à boule sans blesser le caillot (fig. 55). Le sérum est immédiatement réparti dans des ballons ou tubes stérilisés.

L'appareil de Latapie (fig. 56) est destiné à puiser aseptiquement le sang artériel des petits animaux. Le tube trocart (A) très effilé entre dans le réservoir pipette (B) muni d'une effilure coudée deux fois (C) et d'une tubulure (D). Une bague de caoutchouc (E) les fixe. A l'intérieur, est un tube de verre (F) percé de trous qui fixera le caillot. L'appareil est stérilisé à autoclave. On casse



Fig. 54.

Flacon d'Erlenmeyer contenant du sang, maintenu incliné, pendant la coagulation, à l'aide d'un simple billot.

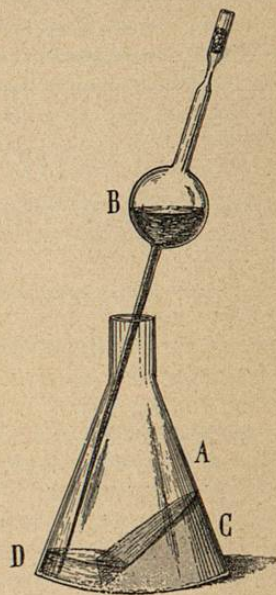


Fig. 55.

Le flacon (A) de la figure 54, redressé après la formation du caillot (C) pour le puisage du sérum (D) à l'aide d'une pipette à boule (B).

l'effilure de (A) et on plonge dans la carotide. On referme l'effilure. On laisse reposer le tube (A) en bas. Le caillot formé, on retourne l'appareil, le sérum tombe en (B); on brise l'effilure (C) et on le recueille. On obtient ainsi 80 p. 100 du sang en sérum. Voy. p. 835 l'appareil pour les grands animaux.

Le dispositif des frères Lumière est plus simple (fig. 57). Il se compose d'un seul tube de verre (D B C A E); le cylindre (A) est hérissé de pointes à son intérieur. On bouche les deux extrémités avec de la ouate et on fait stériliser au four Pasteur.

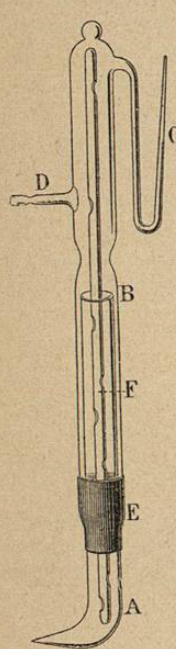


Fig. 56.

Appareil de LATAPIE, pour saigner aseptiquement les petits animaux.

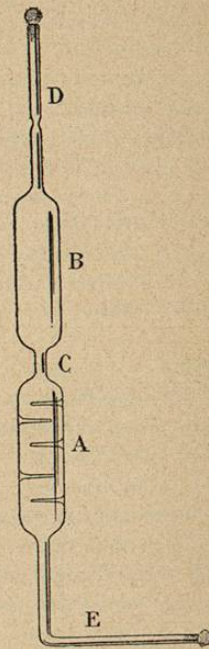


Fig. 57.

Appareil des frères LUMIÈRE pour recueillir aseptiquement le sang des petits animaux.

Pour s'en servir, on adapte à (E) un court tube de caoutchouc muni d'une aiguille en platine iridié et stérilisé à l'autoclave. On introduit l'aiguille dans la veine ou l'artère et on aspire par (D) jusqu'à ce que le sang remplisse (A). On pince alors le caoutchouc, on retire l'aiguille, on incline le tube, on enlève

le tube de caoutchouc, en maintenant l'extrémité de E dans a flamme d'une lampe à alcool, on met un tampon d'ouate. Quand le caillot est formé, on retourne l'appareil : le caillot est retenu par les pointes de (A) ; le sérum s'écoule par (D).

Pour avoir du sérum aseptique des grands animaux (cheval, âne, bœuf), on suivra la méthode que nous décrirons avec grands détails à propos de la *Sérothérapie* (p. 829).

Pour le *sérum humain*, voir plus loin la méthode de prise aseptique du sang.

Le sérum liquide est employé pour conserver intacte la virulence de certains microbes (*Streptocoque pyogène*, etc.) ; il sert à toutes les expériences où on veut rechercher ses effets bactéricides, microbiophiles, agglutinants, etc.

BUMM, en 1885, a cultivé le *Gonocoque* sur sérum humain.

Plus on va, plus on utilise les sérums dans la fabrication des milieux de culture.

2° Sang. — Les milieux à base de sang ont pris récemment une grande importance en bactériologie.

On peut employer le sang directement. C'est le procédé employé par LIGNIÈRES pour cultiver le protozoaire de la Tristeza (*Piroplasma bigeminum*).

Il faut remédier à la coagulation, pour avoir un milieu liquide.

La défibrination (agiter pendant dix minutes dans un flacon résistant stérilisé, contenant des perles de verre) du sang aseptique est souvent employée.

On utilise aussi les propriétés anticoagulantes de certaines substances (peptone, têtes de sangsues, certains sels). On injecte, dans les veines d'un chien une solution, en eau physiologique, à 10 p. 100, de peptone Wilte (0^{gr},3 par kilogramme) ; pendant les deux heures suivantes, la saignée donnera un sang incoagulable. Le lapin ne convient pas à ce procédé. Le sang ainsi obtenu finit par se coaguler ; parfois les chiens sont réfractaires ; le moyen n'est donc pas à recommander.

Pour utiliser les têtes de sangsues, on les durcit pendant quelques jours dans l'alcool fort, on les dessèche et on les broye. On fait bouillir dans l'eau (une tête pour 5 à 10

centimètres cubes d'eau), on filtre et on stérilise à + 105° pendant cinq minutes. On répartit dans les tubes destinés à recevoir le sang. Le sang se coagule à la longue.

Le citrate neutre de soude à 3 p. 1.000 rend le sang incoagulable.

En somme : c'est à la défibrination qu'il faut s'adresser.

Le sang est plus fréquemment additionné à d'autres milieux, particulièrement à la gélose, soit incorporé, soit versé à la surface. C'est sur une gélose sanglante que PFEIFFER et BECK ont, en 1892, cultivé le *Bacille de l'influenza*. Elle a aussi servi à cultiver le *Gonocoque*, le *Bacille de Ducrey*, le *Bacille de Koch* (BEZANÇON et GRIFFON, etc.).

Pour avoir du *sang humain* aseptique, on fait couler dans un tube stérilisé le sang du cordon ombilical, avant la délivrance, après avoir flambé la surface de section ; ou on puise le sang dans une veine du pli du coude avec une seringue stérilisée (voy. p. 325).

3° Lait. — Il convient à la culture de nombreux microorganismes. Il sert en outre à différencier certaines espèces (*B. d'Eberth* et *B. Coli*, par exemple) suivant que celles-ci le coagulent ou le laissent liquide.

On peut le recueillir aseptiquement au pis de la vache (nettoyé et lavé au sublimé) et le distribuer en ballons stérilisés. Un grand nombre de ceux-ci placés à l'étuve, resteront stériles. On s'en assurera en ensemençant une goutte de chacun en bouillon.

En général, on stérilise à l'autoclave à + 110° ou + 115° pendant un quart d'heure. Le lait est alors privé de ses parties grasses qui restent à la surface.

La méthode de Tyndall (une heure à + 65° ou + 70° pendant six jours de suite) est applicable.

Le lait doit être choisi *alcalin*.

Pour savoir si les microbes coagulent le lait par formation d'acide ou par sécrétion de présure, on peut additionner le lait de teinture bleue de tournesol stérilisée. Le lait acide virera au rouge.

Nombre de microbes redissolvent (production de présure et de caséase) le caillot formé (*B. pyocyanique*, *B. subtilis*, etc.)

4° Petit lait. — Le petit lait est employé pour la fabrication de certains milieux. On l'obtient, en chauffant à une douce chaleur, du lait additionné d'une petite quantité de solution étendue d'acide chlorhydrique. On filtre, on neutralise, on stérilise. (Voyez PETRUSCHKY, page 88.)

5° Urine. — PASTEUR s'est beaucoup servi de l'urine pour cultiver certains ferments (1876) et, plus tard, la *Bactéridie charbonneuse*. Ce milieu est bien abandonné aujourd'hui. On peut recueillir l'urine aseptiquement, et se contenter de l'éprouver à l'étuve; sinon elle sera filtrée, neutralisée et stérilisée comme du bouillon. A + 44° l'urine acide devient franchement alcaline. Pour MIQUEL, l'urine normale est peu putrescible; elle l'est davantage après une neutralisation par la soude.

Les solutions d'urée sont quelquefois employées. Il faut savoir que si l'urée sèche supporte bien + 105° pendant une heure, une solution d'urée se décompose vers + 90°.

On a cultivé le *Gonocoque* dans de l'urine additionnée de 1/2 p. 100 de peptone.

6° Sérosités naturelles, Humeur aqueuse. — L'humeur aqueuse a été employée par KOCH pour cultiver « en cellule » la *Bactéridie charbonneuse* et étudier son évolution. On sacrifie un animal. On stérilise, avec un agitateur chauffé, la surface de la cornée qu'on ponctionne avec une pipette en verre ou une seringue stérilisées.

On peut imaginer tout une série de liquides naturels (liquide céphalo-rachidien, extraits d'organes, etc.). Il va sans dire qu'on ajoutera fréquemment, suivant les besoins, aux liquides naturels, des peptones, de la glycérine, du glucose, etc. Ils seront neutralisés si besoin est.

7° Sérosités pathologiques. — On utilise de plus en plus des liquides d'hydrocèle, de pleurésie, d'ascite, (cultures de nombreux microbes exigeant des milieux albumineux).

On peut les recueillir aseptiquement dans un appareil de Potain stérilisé. Comme ces liquides contiennent souvent le microbe pathogène de la maladie, il faut les éprouver avec soin. On pourra les stériliser comme le sérum (méthode de TYNDALL).

8° Œufs. — Les œufs peuvent être employés liquides. Il faut savoir qu'ils ne sont pas toujours aseptiques.

HUEPPE a ainsi cultivé le *V. cholérique*. On secoue violemment un œuf frais pour mélanger le jaune avec le blanc; on lave la coquille au sublimé, et on flambe le bout où se trouve la chambre à air; on ponctionne en ce point avec l'aiguille d'une seringue qui contient la semence, et on pousse quelques gouttes. L'œuf est alors recouvert d'une couche de collodion et mis à l'étuve.

On peut, aussi retirer le blanc seul avec une pipette et le distribuer dans des ballons ou le faire coaguler dans des tubes.

Le jaune est, le plus souvent, employé d'après la formule :

Jaune d'œuf	100 cc.
Eau distillée	1 000 —
Soude à 10 0/0	5 —

B) LIQUIDES ARTIFICIELS

Ce sont des liquides inventés pour les besoins de la bactériologie.

1° Liqueurs chimiquement définies. — Elles ne contiennent pas de substances organiques.

a. *Liquide Pasteur.* — Il date de 1859; c'est la première solution minérale employée comme milieu de culture¹. En voici la formule :

Eau distillée	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Cendres de levure de bière	0 gr. 075

¹ PASTEUR, *Mémoire sur la fermentation lactique*, Annales de physique et chimie, 1859.

PASTEUR modifia plus tard cette formule de la façon suivante pour cultiver la levure de bière :

Eau distillée	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Tartrate d'ammoniaque	0 gr. 1
Cendres de 1 gramme de levure	

b. *Liquide Cohn*. — Le liquide de COHN est ainsi composé :

Eau distillée	200 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	2 —
Phosphate de potasse	2 —
Sulfate de magnésie	1 —
Phosphate tribasique de chaux	0 gr. 1

C'est le *liquide de Mayer* avec addition d'une substance azotée, le tartrate d'ammoniaque.

c. *Liquide Raulin*. — RAULIN a fait son remarquable travail¹ sur les conditions de développement de l'*Aspergillus niger* (champignon) avec le liquide suivant :

Eau	1 500 grammes.
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0 gr. 60
Carbonate de potasse	0 gr. 60
Carbonate de magnésie	0 gr. 40
Sulfate d'ammoniaque	0 gr. 25
Sulfate de zinc	0 gr. 07
Sulfate de fer	0 gr. 07
Silicate de potasse	0 gr. 07

Avec ce milieu, la récolte d'*Aspergillus* était tellement abondante qu'elle équivalait à 10.000 kilogrammes à l'hectare pour un végétal ordinaire.

Malheureusement, toutes ces solutions minérales, excellentes

¹ RAULIN, *Etudes chimiques sur la végétation, Recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel*, Ann. des sciences naturelles, 1870.

pour la végétation des champignons, ne conviennent que très mal à celle des microbes.

d. *Liquide Arnaud et Charrin*. — Le liquide d'ARNAUD et CHARRIN (1892), permettant la végétation du *B. pyocyanique* est le suivant :

PO ⁴ K H ²	0 gr. 100
PO ⁴ Na ² H + 12 Aq	0 gr. 100
CO ² KH	0 gr. 134
Ca Cl ²	0 gr. 050
Mg SO ⁴ + 7 Aq	0 gr. 050
Asparagine cristallisée	5 grammes.
Eau : Q. S. pour faire	1 litre.

Il a permis d'étudier le sort de l'azote, du carbone et de l'oxygène, pendant la végétation du microbe. L'azote est fourni par l'asparagine.

e. *Liquide Ouchinsky* (1893). — Il est une modification du liquide de NOEGELI.

Eau	1 000 gr.
Glycérine	50,0
Chlorure de sodium	7,0
Lactate d'ammoniaque	10,0
Chlorure de calcium	0,1
Sulfate de magnésie	0,2
Bi-phosphate de potasse	1,0

L'azote est fourni par le lactate d'ammoniaque. OUCHINSKY ajoute quelquefois 0,5 p. 100 d'urée ; 0,02 à 0,03 p. 100 d'acide urique ; 0,8 à 1,5 p. 100 de sucre. On ne s'inquiète pas du précipité formé pendant la neutralisation. La plupart des microbes, sauf le *B. d'Eberth* et le *Bacille tuberculeux*, pousseront dans ce milieu. HUGOUNENQ et DOYON n'ont pas réussi à y cultiver le *B. de Löffler* et le *B. du Choléra* qui avaient si bien végété entre les mains d'OUCHINSKY.

f. *Liquide Lepierre*¹. — L'auteur a voulu composer un

¹ CH. LEPIERRE, *Les gluco-protéines comme nouveaux milieux de culture chimiquement définis pour l'étude des microbes*, C. R. Acad. des Sciences, 8 juillet 1901.

milieu azoté, chimiquement défini, suffisamment nutritif pour la plupart des microbes. C'est, ainsi que nous l'avons dit page 70, un des principaux desiderata du bactériologiste. LÉPIERRE a utilisé les produits de dédoublement des albuminoïdes, nommés *glucoprotéines* α . Ces substances sont nutritives tout en n'étant plus protéiques.

Eau	100 grammes.
Glucoprotéine pure (C ^o à C ¹¹)	1 gr. 5 à 2 gr.
Glycérine, glucose ou saccharose	2 à 3 gr.
Chlorure de sodium	0 gr. 5
Sulfate de magnésium	0 gr. 5
Glycérophosphate de calcium	0 gr. 2 à 0 gr. 3
Bicarbonate de potassium	0 gr. 1 à 0 gr. 2

Suivant l'auteur, 45 microbes étudiés ont poussé dans ce milieu aussi bien que dans les bouillons ordinaires.

g. *Eau de mer*. — DUFLOCO, LEJEUNE et BERTRAND (1900) ont utilisé l'eau de mer comme milieu de culture. Ils additionnent d'eau distillée (pour arriver à 9 grammes de sel par litre), de lactate d'ammonium, d'azotate d'ammoniaque et de quelques phosphates. Ils alcalinisent, stérilisent et filtrent. C'est un milieu dépourvu de matières albuminoïdes, et cependant les microbes poussent bien et sécrètent des produits albuminoïdes. L'intérêt de ce milieu résiderait précisément dans ce dernier fait.

2° *Infusions végétales*. — On a préconisé des décoctions de plantes. L'eau de foin a joui d'une grande faveur. Les qualités nutritives de ces infusions sont en général faibles. Elles sont excellentes pour cultiver les champignons, très inférieures pour cultiver des microbes. La préparation se compose des temps suivants : macération, neutralisation, filtration, stérilisation.

L'eau de pomme de terre est obtenue en incorporant, à un demi-litre d'eau, 10 à 20 grammes de pulpe de pomme de terre obtenue à l'aide d'une râpe de nickel. Macération pendant deux heures : ébullition ; filtration ; stérilisation. Ce milieu est légèrement acide.

LUBINSKI cultive le *Bacille de Koch* dans de l'eau de pomme de terre additionnée de 4 p. 100 de glycérine.

L'eau de levure se prépare ainsi. Mettez 400 grammes de levure dans 1000 grammes d'eau, et délayez lentement. Faites bouillir. Neutralisez ou alcalinisez légèrement avec une solution de soude. Filtrez. Stérilisez à l'autoclave à + 115° pendant un quart d'heure.

L'eau de malt est une solution à 10 p. 100 de malt (orge germée) dans de l'eau. Chauffez à + 55°-58° pendant une heure, sans dépasser cette température, sous peine de détruire la diastase. Portez ensuite à l'ébullition, filtrez, stérilisez à + 115°, etc.

G. ROUX (1889) a préconisé l'eau de touraillon comme un liquide souvent supérieur aux meilleurs bouillons, pour la culture des microbes et particulièrement de certains streptocoques. Le touraillon est le résidu desséché du malt qui a servi aux brasseurs. L'infusion est à 10 p. 100 comme l'eau de malt. Les milieux au touraillon ne permettent pas le développement du *Vibron cholérique*; ils sont antiseptiques vis-à-vis de ce microbe (G. Roux).

Pour la *décoction de fruits* (prunes, etc.), on laisse macérer pendant un jour dans de l'eau, on fait cuire dans cette eau sans écraser. On filtre, on neutralise, on stérilise.

On a aussi employé des *décoctions de crottin de cheval* ou de tout autre herbivore. On met macérer une partie de crottin frais dans trois parties d'eau pendant vingt-quatre heures ; on fait bouillir, on filtre, etc.

Le vin neutralisé et stérilisé avait été employé par PASTEUR pour cultiver en grand le *Bacillus anthracis*.

3° *Infusions animales (bouillons)*. — Le bouillon est le milieu universellement employé pour cultiver la grande majorité des bactéries. C'est le liquide nutritif courant dans les laboratoires.

a. *Bouillons de viande*. — Ce sont les liquides de choix. PASTEUR s'était d'abord servi de bouillon de poulet. La viande de bœuf ou de veau est préférable. Le *bouillon simple* est peu usité :

on y ajoute en général différentes substances, destinées à augmenter sa puissance nutritive, spécialement de la peptone.

On prend 500 grammes de viande choisie, débarrassée des os, de la graisse, des tendons, etc., et hachée finement. On les place dans un récipient contenant 1000 grammes d'eau distillée¹. On mélange soigneusement. On peut alors laisser macérer à froid pendant vingt-quatre heures, ou à chaud pendant une demi-heure (à + 50° environ, c'est-à-dire à une température qui ne coagule pas l'albumine); la macération à froid est préférable. On exprime sur un linge mouillé, et on ramène la quantité à 1000 grammes. On ajoute 10 grammes de chlorure de sodium (la viande est pauvre en chlore et en sodium), 20 grammes de peptone Chapoteaut, et quelquefois 1 gramme de phosphate de soude. On fait bouillir pendant vingt ou trente minutes. On écume, on dégraisse, on filtre sur papier épais et on neutralise. Le bouillon est normalement acide; il rougit le papier de tournesol bleu; or, la grande majorité des microbes réclament un milieu neutre ou légèrement alcalin. On verse goutte à goutte dans le bouillon une solution de carbonate de soude, jusqu'à ce que le papier de tournesol donne une réaction neutre ou légèrement alcaline. On filtre de nouveau si c'est nécessaire.

Il faut alors mettre le bouillon dans le récipient où il sera stérilisé et conservé. Nous employons des flacons à deux tubulures d'une contenance d'un litre (fig. 58): les deux tubulures sont bouchées par un tampon d'ouate. A travers le tampon de la tubulure latérale (A) passe un tube de verre (B) qui plonge jusqu'au fond du flacon et est recourbé en U renversé au dehors du flacon. La branche externe de l'U est reliée par un petit tube de caoutchouc (C), long de 5 centimètres, à un tube de verre (D) dont l'extrémité inférieure est effilée et fermée à la lampe comme une pipette. Le flacon est rempli de bouillon aux deux tiers et stérilisé à l'autoclave par une exposition de

¹ Il va sans dire qu'on peut modifier la proportion de viande et d'eau pour avoir, s'il en est besoin, des bouillons moins riches. CHAUVEAU a cultivé son vaccin charbonneux dans du bouillon de veau très pauvre à 1/5 au lieu de 1/2.

vingt à trente minutes à + 110° à 120°. Pendant le chauffage les tubes B, C, D se sont purgés d'air et remplis de vapeur d'eau qui se condense au refroidissement; le bouillon les envahit alors, le siphon s'amorce donc de lui-même et le flacon a l'aspect représenté dans la figure 58.

Il se produit en général un dépôt assez abondant (surtout si le chauffage a été trop intense ou trop prolongé), qui se condense rapidement au fond du récipient, et ne trouble que les dernières gouttes lors de la décantation.

Pour s'assurer que la stérilisation a été parfaite, on place pendant vingt-quatre heures le flacon chargé de bouillon dans une étuve à + 38°; il doit rester limpide. Un flacon de bouillon ainsi préparé peut être indéfiniment conservé dans une armoire à l'abri de la poussière; le liquide perd cependant à la longue ses propriétés nutritives.

Lorsqu'on veut transvaser le bouillon du flacon dans des ballons, on opère de la façon suivante (fig. 58). On place une pince de Mohr (E) sur le tube en caoutchouc (C); on flambe l'extrémité effilée du tube de verre (D) et on la casse avec des pinces flambées; on rellambe l'extrémité ouverte et on l'introduit dans le goulot d'un ballon stérilisé. Le ballon doit être penché presque horizontalement, et le capuchon de papier tenu verticalement l'ouverture en bas, afin d'éviter la chute des germes de l'atmosphère dans le ballon ou dans son capuchon. Ces ballons ont été décrits page 24 et figure 12. Une seule main suffit à tenir le ballon et son capuchon, ce dernier par les deux derniers doigts (fig. 59). On presse alors de l'autre main sur la pince, et le liquide coule par siphonnement dans le ballon. On lâche la pince lorsque le tiers inférieur du ballon est chargé de bouillon, on retire le ballon dans une position aussi horizontale que possible, on flambe le goulot et on remet le capuchon avec la main devenue libre. On remplit ainsi un grand nombre de



Fig. 58.

Flacon pour la conserve et la distribution du bouillon (système du siphon).