

A. ISOLEMENT PAR DES TEMPÉRATURES ÉLEVÉES. — Ces températures seront mortelles ou simplement dysgénésiques pour les autres germes.

a. *Températures tuant les autres germes.* — On chauffe la semence à une température suffisante pour tuer tous les germes autres que celui qu'on désire cultiver. Cette méthode ne s'adresse naturellement qu'aux microbes très résistants, se reproduisant par sporulation; on sait que la plupart des spores résistent à des températures supérieures à + 100°. Une des spores les plus résistantes est celle du *Bacille de la pomme de terre* (*Bacillus mesentericus*) qui n'est pas toujours tuée par un chauffage à + 130°; aussi voit-on fréquemment les fragments de pommes de terre, quoique stérilisés, se recouvrir d'une pellicule plissée qui n'est autre qu'une culture de *Bacillus mesentericus*. La stérilisation, ayant tué tous les autres germes, avait isolé ce microbe à l'état de pureté.

On savait depuis longtemps que plusieurs liquides organiques, bien que soumis à l'ébullition et maintenus à l'abri des germes de l'air, arrivent à être souillés par des végétations microbiennes. C'est COHN qui montra le premier, en 1876, par une expérience faite sur l'infusion de foin, que ces cultures sont composées de microbes à spores très résistantes et spécialement de *Bacillus subtilis*. BREFELD a d'ailleurs vu directement sous le microscope les spores germer après ébullition. C'est en échouant dans la stérilisation des infusions de foin par la simple ébullition que TYNDALL a dû imaginer la stérilisation par *chauffage discontinu* pour se débarrasser des germes provenant des spores du *B. subtilis* (voir p. 48).

PASTEUR a directement appliqué le principe du chauffage à l'isolement des anaérobies et particulièrement du *Vibron septique* (voir ch. VI, p. 214). En 1879, MIQUEL a isolé le *Bacillus ureæ* en chauffant, à + 80° et + 90° pendant deux heures, de l'urine putréfiée ou de l'eau d'égout.

Citons un exemple avec détails. On veut obtenir une culture pure de *Bacillus subtilis* (espèce d'ailleurs mal définie et comprenant nombre de variétés). On met une poignée de foin dans de l'eau maintenue pendant plusieurs heures entre + 30° et + 40°.

On obtient une infusion rouge; on la dilue jusqu'à coloration jaune d'or, on la filtre sur mousseline, on la neutralise avec du carbonate de soude. On répartit le liquide dans plusieurs ballons qu'on fait bouillir pendant dix minutes et qu'on reporte à l'étuve à + 38°. Au bout de quarante-huit heures plusieurs ballons seront recouverts d'une pellicule résistante composée de *Bacillus subtilis* à l'état de pureté.

Il va sans dire que ce procédé d'isolement ne peut être utilisé lorsqu'il existe un mélange de plusieurs microbes à spores résistantes. Il est peu employé pour l'isolement des aérobies; il est très recommandé au contraire pour isoler les anaérobies.

b. *Températures dysgénésiques pour les autres germes.* — On se sert bien plus souvent de la chaleur, pour isoler les aérobies, en cultivant le mélange microbien à une température dysgénésique pour la plupart des espèces. Tous les microbes, en effet, ne poussent pas dans les mêmes limites de température. La végétation cesse en général vers + 40°, mais certains d'entre eux se cultivent encore bien au-dessus de cette température: *B. de la tuberculose aviaire*, *B. coli*, *B. d'Eberth*; etc. Il suffira alors d'ensemencer un ballon de bouillon avec le mélange contenant un de ces microbes, et de le placer dans une étuve à + 42°, 43°, 44°; le bouillon se troublera et fournira seulement les espèces poussant à cette température.

RODET¹ s'est servi de cette méthode pour isoler des eaux le *B. coli* ou le *B. d'Eberth*. Ces deux microbes poussent à + 44°, 5. On ensemence du bouillon, et on le dépose dans une étuve réglée spécialement à cette température. S'il ne se produit aucun trouble au bout de quarante-huit heures, on peut affirmer que l'eau ne contenait ni *B. coli* ni *B. d'Eberth*; si les ballons se sont troublés, on a presque sûrement affaire à l'un de ces deux microbes. L'analyse, terminée dans le premier cas en quarante-huit heures, est bien simplifiée dans le second.

¹ RODET, *Importance de la température pour la détermination du Bacille typhique*, Soc. Biologie, 29 juin 1889.

B. ISOLEMENT PAR DES TEMPÉRATURES BASSES. — Lorsqu'un microbe pousse à de basses températures, on peut l'isoler en faisant plusieurs passages de culture à une température où il végète seul. ARLOING a isolé ainsi le *Pneumo-bacillus liquefaciens bovis* qui pousse à + 5°.

2° Isolement par inoculation. — Lorsqu'on veut isoler une espèce pathogène d'un produit souillé par d'autres microbes, et qu'on connaît une espèce animale sensible à ce microbe, il suffit d'inoculer le tout à l'animal et de recueillir les produits pathologiques loin du point d'introduction. Il faut, bien entendu, pour que ce procédé réussisse, rechercher un microbe qui ne reste pas cantonné dans la plaie d'inoculation. C'est ainsi que l'inoculation au cobaye permet de recueillir du *Vibrio septique* pur dans la sérosité péritonéale, tandis que le *B. de Nicolaïer* (tétanos) reste localisé au point inoculé.

Le procédé d'isolement par inoculation est le meilleur de tous, lorsqu'il peut être employé. DAVAINÉ, PASTEUR s'en sont servis pour obtenir le microbe d'une septicémie du lapin; KOCH a de même découvert une septicémie de la souris. Mais l'exemple le plus fameux est celui de la culture du *Bacille tuberculeux*. On sait, depuis KOCH (1882), qu'il suffit d'inoculer un cobaye avec des produits tuberculeux quelconques pour avoir dans les ganglions et la rate de cet animal une semence absolument pure de bacille tuberculeux. L'inoculation au cobaye est toujours le premier temps de la préparation d'une culture pure du *Bacille de Koch*. On peut ainsi isoler le *Staphylocoque pyogène*, le *Streptocoque pyogène*, le *Bacillus anthracis*, etc., en inoculant le lapin et en cultivant son sang. On injecte des crachats de pneumonique à une souris ou à un lapin; le *Pneumocoque* se trouve dans la moelle osseuse à l'état de pureté, etc. J. COURMONT a isolé un *Bacille de la tuberculose bovine*¹ en inoculant au cobaye et au lapin des produits tubercu-

¹ J. COURMONT, *Sur une nouvelle tuberculose bacillaire du bœuf*, Etudes sur la tuberculose, 1890.

leux du bœuf; le bacille était à l'état de pureté dans le sang des animaux. Il en a été de même pour un autre *Streptobacille tuberculeux*, également d'origine bovine, découvert par J. COURMONT et NICOLAS (1897). On pourrait multiplier ces exemples.

3° Isolement par cultures liquides. — L'isolement des microbes par les cultures liquides est incontestablement entouré de difficultés. Il ne doit pas cependant être abandonné. Il faut se souvenir que nombre de microbes poussent bien mieux en bouillon que sur milieux solides, et que la gélatine, qui est le milieu solide le plus maniable, doit être maintenue à + 22° seulement. L'isolement de beaucoup d'espèces et la numération exacte des microbes contenus dans un produit pathologique, une eau, etc., n'est donc pas possible avec la gélatine; or la gélöse est peu maniable. Les cultures liquides conservent en somme leur importance.

Nous venons de voir que les cultures liquides chauffées (cultures du *B. subtilis*) ou mises à des températures dysgénésiques pour la plupart des microbes (cultures de *B. coli* ou de *B. d'Eberth*) pouvaient être pures en raison de l'action de la chaleur. Nous ne voulons parler maintenant que de l'isolement des aérobies par le simple *fractionnement* de la semence en cultures liquides. Ce fractionnement peut se faire par dilution ou par division du liquide en gouttes extrêmement petites.

Nous citerons, en outre, pour mémoire, la méthode, des plus primitives, employée par KLEBS, en 1876. Les espèces qui végètent côte à côte dans un bouillon ensemencé avec un mélange microbien ne sont pas fatalement disséminées en proportions égales dans tous les points du liquide. Les bactéries immobiles tombent au fond du ballon, les mobiles se retrouvent dans toutes les couches, les aérobies francs poussent en pellicule à la surface, les autres préfèrent les couches inférieures moins riches en oxygène; enfin, certains microbes végéteront avec une telle rapidité qu'ils étoufferont pour ainsi dire toutes les autres espèces. Parti de ces données classiques, KLEBS était

arrivé à avoir des cultures pures en prélevant de très petites quantités de semence impure pour la reporter dans un nouveau ballon, et ainsi de suite. On n'est jamais sûr d'arriver au but par cette méthode, en tout cas très longue.

A. MÉTHODE DE DILUTION. — Elle consiste à diluer une goutte de semence dans une telle quantité de liquide stérilisé qu'une goutte du mélange ne puisse contenir qu'un seul microbe. Cette goutteensemencée en bouillon donne une culture pure.

Cette méthode, déjà employée, en 1873, par Van TIEGHEM et LE MONNIER pour l'isolement des champignons (Mucorinées), a été introduite en bactériologie par NOEGELI¹, en 1878, et perfectionnée depuis par BREFELD², MIQUEL³, etc.

Nous n'insisterons pas actuellement sur la technique de l'isolement par les cultures liquides; elle sera développée tout au long au chapitre de l'Analyse de l'eau (ch. XIV).

La méthode de la dilution est encore employée pour l'ensemencement des cultures solides (voy. Cultures sur plaques, p. 171).

B. MÉTHODE DU FRACTIONNEMENT EN GOUTTELETTES. — Elle est due à CHAUVEAU et ARLOING et sera décrite avec détails au chapitre de l'Analyse de l'eau (p. 392). Le principe de la méthode réside dans l'emploi d'une pipette suffisamment fine pour fractionner le centimètre cube en 130 à 180 gouttes. Chaque goutteensemence un ballon. Une dilution préalable peut être le premier temps de l'opération.

C. MÉTHODE DES CULTURES FILTRANTES. — Nous avons déjà dit (p. 12) que les microbes ne sont pas toujours retenus par les bougies de porcelaine, Chamberland ou autres. CAMBIER (1901)

NOEGELI, *Untersuchungen über niederen Pilze*, 1878.

² BREFELD, *Untersuchungen über die Spaltpilze (Bacillus subtilis)* 1878.

³ MIQUEL, *Organismes vivants de l'atmosphère*, Paris, 1882; et *Annales de l'Observ. de Montsouris, passim*.

a cherché à utiliser ce passage de certains microbes à travers les filtres pour isoler le *B. d'Eberth* des autres microbes des eaux ou des selles. Une culture impure contenant du *B. d'Eberth* placée dans une bougie, plongeant elle-même dans du bouillon nutritif, ensemencerait ce dernier, autour de la bougie, uniquement de *B. d'Eberth*, ce dernier passant à travers les pores de la bougie, grâce à sa grande mobilité. On verra (p. 417) que cette propriété n'est pas spéciale au *B. d'Eberth*.

LESIEUR a repris cette question, dans notre Laboratoire. Le dispositif employé (fig. 107) se compose d'un tube d'Esmarch (A) contenant du bouillon (l) dans lequel plonge une bougie Chamberland (B), petit modèle, marque F. Onensemence dans la bougie et on surveille le bouillon extérieur; dès qu'il se trouble, on fait les examens nécessaires pour constater la pureté de la culture.

Voici un tableau montrant la rapidité avec laquelle plusieurs microbes traversent ces bougies.

	En bouillon ordinaire.	En milieu de Cambier.
Bacille d'Eberth.	+ en 18 heures	+ en 24-36 heures.
Colibacille	+ » 18 »	+ » 24 36 »
Vibron cholérique	+ » 24 »	+ » 18 24 »
<i>M. agilis citreus</i>	+ » 18 »	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ » 24 »	—
<i>Proteus vulgaris</i>	+ » 24 »	+ » 4 jours
<i>B. anthracis</i>	+ » 24 »	+ » 4 »
<i>M. prodigiosus</i>	+ » 36 »	+ » 3 »
<i>B. lactis aerogenes</i>	+ » 36 »	+ » 4 »
<i>B. pyocyanique</i>	+ » 48 »	+ » 3 »
<i>B. vert de l'eau</i>	+ » 48 »	+ » 3 »
<i>B. mesentericus vulg.</i>	+ » 48 »	+ » 3 »
<i>B. diphtérique</i>	+ » 48 »	—
<i>Actinomyces bovis</i>	+ » 60 »	—

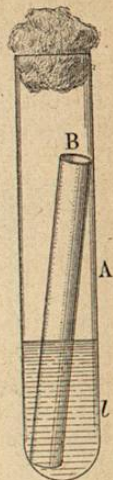


Fig. 107.
Méthode de Cambier. Dispositif de LESIEUR.

	En bouillon ordinaire.	En milieu de Cambier.
M. urex	+ » 60 heures	+ » 3 jours
B. de la diphtérie aviaire	+ » 120 »	+ » 4 »
B. subtilis	—	+ » 3 »

On voit que la plus ou moins grande rapidité de passage peut être utilisée pour isoler telle espèce, surtout le *B. d'Eberth*, le *B. coli*, le *V. cholérique*.



Fig. 108.

Cultures en tube de sable (CARNOT et GARNIER).

P. CARNOT et GARNIER ont utilisé le même principe pour leurs cultures en *tubes de sable*. La (figure 108) montre le dispositif. Un petit tube de verre en U, avec une branche fine (B), reçoit du liquide de culture (l) sur une hauteur de 0^m,10 environ. On projette lentement dans celui-ci du sable de quartz très fin, purifié par un séjour de quarante-huit heures dans l'aide chlorhydrique, bien lavé pendant plusieurs jours et calciné au four. La couche de sable (s) charge la grosse branche (A) sur une hauteur de 0^m,10. On stérilise à l'autoclave. Un bourron de coton de verre (C) empêche le sable de gagner la petite branche. Il faut verser le sable lentement dans le liquide pour éviter les bulles d'air. Onensemence le bouillon de la petite branche et on attend que le bouillon qui surmonte le sable se trouble.

Le *Vibrion cholérique*, le *B. d'Eberth*, le *B. de la psittacose*, les *Colibacilles* passent rapidement.

4° Isolement sur les milieux solides. — C'est la méthode de KOCH¹; c'est la plus couramment employée. Le principe est simple. Si onensemence de la gélatine ou de la gélatine-gélose à l'état liquide, de façon que les microbes soient uniformé-

¹ KOCH, *Zur Untersuchung von pathogenen Organismen*. Mittheil. aus dem kaiserl. Gesundheitsamt, 1881.

ment répartis dans le milieu, et qu'on fasse solidifier celui-ci en couche mince, chaque microbe donnera une colonie pure, végétant à la surface, complètement isolée des autres. On peut alors en prendre une parcelle et avoir une culture pure en tube de gélatine ou en ballon de bouillon. Les temps de l'opération seront donc toujours les suivants : 1° liquéfaction au bain-marie de la gélatine ou de la gélatine-gélose; 2° ensemencement avec une très petite quantité du produit à analyser bactériologiquement; 3° agitation pour répartir uniformément les germes; 4° étalage du milieu en couche mince et refroidissement; 5° prise aussi hâtive que possible de chaque colonie qui sera réensemencée.

Il est cependant des cas où on procède autrement; onensemence, par de nombreuses stries, un milieu déjà solidifié, sans recharger l'aiguille de platine ou la pipette. L'aiguille fait des stries de moins en moins contaminées et les dernières donnent des cultures pures; nous dirons deux mots de ce procédé.

Enfin nous renvoyons aux chapitres de l'*Analyse de l'eau, de l'air, de la terre* pour la description des appareils spéciaux.

A. CULTURES SUR PLAQUES DE KOCH. — La méthode primitive de KOCH, étalant la gélatine sur des *plaques*, n'est presque plus

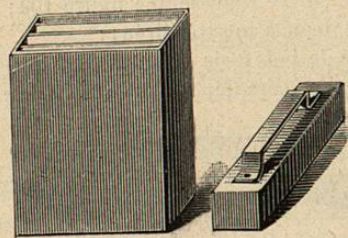


Fig. 109.

Plaques de Koch dans leur boîte en cuivre.

employée, en raison de l'outillage compliqué et embarrassant qu'elle nécessite et de son peu de sécurité comme asepsie. Nous devons cependant la décrire; elle a servi à isoler le *Vibrion cholérique*.

Nous supposons d'abord qu'on emploie la *gélatine*. Il va sans dire que ce milieu n'isolera que les microbes végétant à + 22°; c'est ainsi qu'on ne saurait obtenir des colonies de *B. diphtérique*, de *B. de la morve*, de *Pneumocoque*, etc., sur gélatine. C'est son grand défaut.

L'outillage nécessaire est le suivant :

1° Des plaques de verre de vitre rectangulaires de 10 centi-

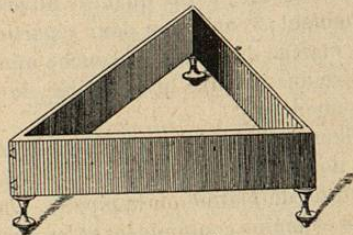


Fig. 110.

Triangle de bois à vis calantes pour les cultures sur plaques de gélatine.

mètres de largeur sur 14 de longueur; lavées comme il a été dit au chapitre II (p. 29), et stérilisées par la chaleur sèche dans la boîte de cuivre représentée figure 109;

2° Trois tubes de gélatine stérilisée;

3° Un triangle de bois à vis calantes (fig. 110);

4° Une plaque de verre dépoli, large et épaisse;



Fig. 111.

Petits bancs en verre pour les cultures sur plaques de gélatine.

5° Un cristalliseur recouvert d'une plaque de verre très large;

6° Un niveau à bulle d'air;

7° Une cloche en verre;

8° Un second cristalliseur coiffé d'un couvercle en verre;

9° De petits bancs en verre (fig. 111);

10° Du papier filtre et une solution de sublimé;

11° Une aiguille de platine ou plusieurs pipettes.

On dispose (fig. 112) le triangle de bois (A) sur une table et on le recouvre de la plaque de verre dépoli (B) qui reçoit elle-même le premier cristalliseur (C). Ce dernier est rempli d'eau froide ou de glace, jusqu'au bord et recouvert par la plaque de

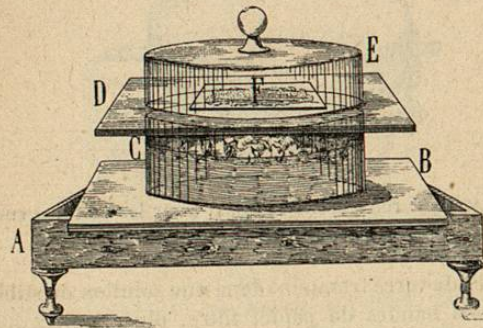


Fig. 112.

Dispositif pour le refroidissement des plaques de gélatine dans une situation horizontale.

verre large (D). Celle-ci est rendue horizontale dans toutes ses directions au moyen des vis calantes et du niveau à bulle d'air. L'horizontalité est indispensable pour l'étalement de la gélatine sur les plaques (F); l'eau froide est destinée à hâter la solidification de la gélatine. La cloche (E) est placée sur la lame de verre. Toutes ces opérations préliminaires sont bien plus commodes avec l'appareil perfectionné de Roux (fig. 113). C'est un tambour métallique supporté par des vis calantes, avec deux ajutages latéraux disposés de façon qu'une circulation d'eau puisse se faire à l'intérieur du tambour.

Il faut ensuite préparer le second cristalliseur (à couvercle) qui recevra les plaques solidifiées et constituera une *chambre humide aseptique et antiseptique*. Les deux parties ayant été soigneusement lavées, on place dans le fond du cristalliseur

une feuille de papier filtre taillée en rond. On verse dans le cristalliseur quelques centimètres cubes d'une solution de sublimé à $\frac{1}{1000}$ qu'on promène contre les parois et qui restera en imbibant le papier; on fait de même pour la cloche qu'on vide complètement et qu'on place sur le cristalliseur.

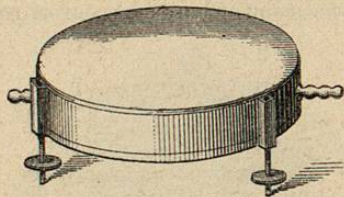


Fig. 113.

Tambour métallique réfrigérant de Roux, pour les cultures sur plaques de gélatine.

Trois bancs de verre trempent dans une solution de sublimé, ainsi que trois bandes de papier filtre, plus étroites que les bancs et numérotées 1, 2, 3.

Il vaudrait mieux stériliser toute cette verrerie à la chaleur sèche.

Tout étant ainsi préparé, on retire avec une pince flambée une des lames de verre de la boîte en cuivre (fig. 409) et on la dépose (F) sur la lame nivelée (D) sous la cloche (E) (fig. 112). On liquéfie ensuite trois tubes de gélatine, qu'on maintient dans un bain-marie à $+ 30^{\circ}$ pendant tout le temps de l'opération. (Ne pas ensemercer de la gélatine trop chaude, qui tuerait les microbes introduits.) On ensemerce le premier avec une très fine goutte de semence et on l'agite avec soin. On porte une goutte du premier dans le second, qu'on agite aussi. Une goutte du second ensemerce le troisième, également agité pour bien répartir les microbes. Ces tubes sont numérotés 1, 2, 3. On prend alors le premier, on le débouche, on flambe l'orifice, et on le verse sur la plaque (F) en soulevant légèrement la cloche (E). La gélatine ne doit pas atteindre les bords de la plaque. Dès que la solidification de celle-ci est complète

on la dépose perpendiculairement sur un des petits bancs recouvert de la feuille de papier filtre 1, qu'on a placé dans le cristalliseur à cloche (chambre humide). On opère de même successivement pour les trois tubes de gélatine qui forment trois plaques superposées et numérotées dans la chambre humide (fig. 114) qu'on porte à $+ 21^{\circ}$.

L'opération est terminée. On n'a plus qu'à attendre le déve-

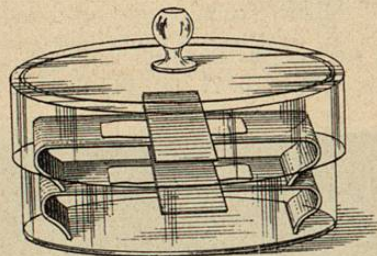


Fig. 114.

Cristalliseur contenant les plaques de gélatine ensemençées.

Il devrait contenir 3 plaques superposées au lieu de 2. Les bandes de papier devraient être numérotées.

loppement des colonies, qu'on ira puiser avec une aiguille de platine ou une pipette (quelquefois avec l'aide de la loupe si les colonies sont très rapprochées), pour les ensemercer en tubes. A ce moment, on s'aperçoit d'un nouvel inconvénient des cultures sur gélatine; plusieurs colonies la liquéfient et peuvent envahir la plaque en une nuit; celle-ci est alors perdue, l'isolement des colonies n'existant plus. Nous verrons à propos des analyses d'eau (p. 400) comment on peut se préserver de l'envahissement des colonies liquéfiantes. Habituellement, les plaques 1 et 2 sont trop riches, les colonies sont trop rapprochées pour qu'on puisse les saisir isolément; la plaque 3, contenant naturellement beaucoup moins de germes (dilutions successives), sera habituellement la meilleure.

On aura avantage, en été, à se servir de *gélatine-gélose* au lieu de gélatine (voy. p. 111). La *gélose* ne peut être employée,

n'étant liquide qu'à des températures qui tueraient ou tout au moins atténueraient les microbes ensemencés.

On peut conserver longtemps les plaques de gélatine *fixées* à la période de développement qu'on désire observer plus tard. On trempe la plaque dans une solution concentrée d'alun pendant dix minutes. On lave plusieurs fois de suite pour enlever les traces d'alun et on laisse sécher. Tout développement microbien est arrêté.

B. CULTURES SUR PLAQUES EN BOITES DE PÉTRI. — Nous avons décrit les boîtes de Pétri (p. 27, fig. 18). Ce sont des cristalli-

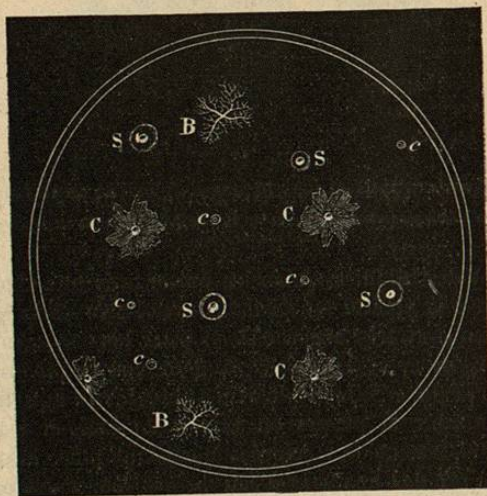


Fig. 115.

Colonies sur gélatine en boîte de Pétri (voy. p. 640).

soirs minuscules, à couvercles, stérilisés, conservés dans leur enveloppe de papier stérilisé, et recevant directement la gélatine liquide ensemencée. Les bords du petit cristalliseur retenant la gélatine rendent inutiles les appareils compliqués destinés à maintenir l'horizontalité. Le procédé par boîtes de

Pétri a définitivement détrôné le procédé de Koch. La préparation des tubes de gélatine est la même que dans le procédé de Koch, mais chacun d'eux est versé dans une boîte de Pétri légèrement entr'ouverte. Une étiquette est collée sur chaque boîte. Les boîtes de Pétri peuvent être mises dans une chambre humide pour éviter la dessiccation de la gélatine, il suffit de placer dans l'étuve un cristalliseur rempli d'eau. L'examen des colonies, leur prise se font d'après les principes généraux (fig. 115).

C. CULTURES SUR PLAQUES EN TUBES DE ROUX.
— Le tube de Roux est encore plus parfait que la boîte de Pétri, car il supprime toutes les chances de contamination du transvasement et permet donc la conservation à l'état de pureté des microbes à évolution lente. C'est un tube de verre long de 25 à 30 centimètres et large de 2 à 3 centimètres, sauf à la partie supérieure plus étroite (fig. 116). Il est chargé d'une petite quantité de gélatine ou de gélatine-gélose, fermé à la ouate et stérilisé à l'autoclave (plusieurs séances sans pression). Au moment de l'utiliser, on fond la gélatine, on l'ensemence, on agite vivement, et on couche le tube sur le côté. La gélatine s'étend en plaques sans pouvoir pénétrer dans la partie étroite. Il est bon de coiffer le tube d'un capuchon de caoutchouc. On pourra naturellement faire des dilutions dans plusieurs tubes successifs.

Le procédé de Roux réduit l'opération à un seul temps, puisque c'est le tube même qui était versé sur la plaque ou en boîte de Pétri qui est couché et contient la plaque de gélatine.

Si on veut examiner à la loupe une colonie par sa surface libre, on coupe longitudinalement le tube de verre parallèle-



Fig. 116.

Tube de Roux pour cultures sur plaques de gélatine.

ment à la plaque de gélatine ; un des demi-cylindres contient la culture étalée.

La prise des colonies se fait comme dans un tube ordinaire.

L'inconvénient du tube de Roux réside dans la trop grande épaisseur de la gélatine au milieu de la plaque ; nombre de microbes sont inclus profondément.

On peut remplacer le tube par le flacon représenté (fig. 21) ; la gélatine s'étale en couche mince et égale.

D. CULTURES SUR PLAQUES ENROULÉES (MÉTHODE D'ESMARCH¹). —

C'est le procédé de choix. La gélatine est enroulée le long des parois du tube. La couche de gélatine a ainsi une minceur très grande et uniforme.

Nous avons déjà parlé (p. 27) des tubes nécessaires à ce procédé et (p. 104, fig. 71) de la façon de les charger de gélatine. Il faut avoir de larges tubes à essai de la dimension des tubes à pomme de terre, mais sans étranglement. Ils sont stérilisés avec une très petite quantité de gélatine formant au fond un culot de 1 centimètre de hauteur au plus. On les liquéfie, on lesensemence, on fait une série de dilutions absolument comme dans les procédés précédents. La gélatine, une fois ensemencée et agitée, est enroulée. C'est là le point spécial de la technique. On bouche à la ouate, et on coiffe d'un large capuchon de caoutchouc. On couche alors le tube horizontalement en tenant chaque extrémité avec une main, et lorsque la gélatine n'est plus qu'à un centimètre ou deux du tampon, on imprime au tube un rapide mouvement de rotation sur son axe, de façon à enrouler la gélatine sur tout le pourtour des parois. Lorsqu'on voit que tous les points sont bien mouillés par la gélatine², on continue le mouvement de rotation sous un filet d'eau froide tombant d'un robinet sur le tube et s'éta-

¹ ESMARCH, *Über eine Modification des Koch'sen Plattenverfahren*; *Zeitschrift für Hygiene*, 1886.

² On peut s'aider de l'aiguille de platine pour bien mouiller de gélatine toute la superficie du tube.

lant sur lui. Il faut porter alternativement toute la longueur du tube sous l'eau froide et spécialement le fond du tube qui, au contact des doigts, se refroidit plus difficilement. Le capuchon de caoutchouc est indispensable pour empêcher le tampon de ouate d'être mouillé. Jamais la gélatine ne doit toucher le tampon.

En quelques minutes la gélatine est solidifiée. Si l'enroulement est bien fait, la gélatine doit être répandue en couche si mince et si uniforme qu'elle est invisible. Le tube est étiqueté et porté à l'étuve.

On pourrait rouler, par la méthode d'Esmarch, les tubes de Roux précédemment décrits ; on serait plus sûr que la gélatine ne viendrait pas souiller la ouate.

L'examen des colonies (fig. 117), leur prise avec l'aiguille de platine ne présentent aucune difficulté avec la méthode d'Esmarch. On peut marquer d'un point à l'encre, sur la surface externe du tube, les colonies qu'on veut continuer à examiner ; il n'en existe jamais deux superposées en épaisseur. L'inconvénient des cultures liquéfiantes subsiste naturellement comme dans toutes les cultures sur gélatine.

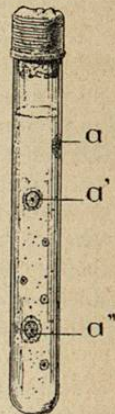


Fig. 117.

Tube d'Esmarch avec 3 colonies de *Colibacille* (a, a', a'') et plusieurs petites colonies de microbes divers.

E. CULTURES D'ISOLEMENT PAR STRIES SUR GÉLOSE. —

On ne peut faire servir l'isolement par cultures sur gélatine à tous les besoins de la bactériologie. Le *B. de Löffler*, le *B. de la morve*, le *Pneumocope*, et bien d'autres microbes, ne végètent pas aux températures inférieures à + 23° où la gélatine reste solide. D'autre part, on ne peut ensemencer de la gélose à l'état liquide sous peine de tuer ou d'atténuer les germes de la semence, en raison de la haute température (+ 70°) à laquelle se liquéfie ce milieu. On ne peut donc enrouler ou étaler de la gélose ensemencée. On se sert alors de la méthode suivante. On coule de la gélose dans une boîte de Pétri et on laisse

refroidir. On fait alors, sur la surface de la gélose, avec l'anse de platine chargée de la semence, et promenéée très légèrement, une série de stries disposées par exemple en quadrillage. L'anse de platine se dépouille des germes au fur et à mesure qu'on l'essuie ainsi sur la gélose, et les dernières stries donneront des colonies suffisamment isolées.

On peut faire la même opération en faisant des stries successives sur plusieurs tubes ordinaires de gélose à surface oblique. Les derniers tubes offriront des colonies séparées.

On peut faire de même avec des tubes de sérum, ainsi que nous allons le voir.

VEILLON épuise successivement la semence dans l'eau de condensation de 3 ou 4 tubes de sérum ou de gélose, puis il incline les tubes pour que l'eau enseme la surface solide. La dilution favorise l'isolement des colonies.

5° Isolement par l'emploi de milieux spéciaux. — L'idéal, en bactériologie, serait de posséder un milieu spécial à chaque espèce microbienne, permettant la végétation de ce microbe à l'exclusion des autres. L'isolement serait alors facile. Si nous ne possédons pas de méthode générale aussi commode, nous savons cependant isoler certains microbes en nous servant de leur prédilection pour tel ou tel milieu ; pour certains même, la composition d'un milieu spécial est chose indispensable.

L'exemple le plus frappant de cette méthode est l'isolement du *Bacille de Löffler* qui sert à faire le diagnostic bactériologique de la diphtérie (voir p. 631), et à obtenir, si on le désire, des cultures pures de ce bacille (voy. p. 611) ROUX et YERSIN recommandent l'ensemencement par stries sur des tubes de sérum gélifié (par la méthode que nous avons décrite page 92) avec une spatule de platine chargée d'une parcelle de fausse membrane. Le *B. de Löffler* a la propriété de végéter beaucoup plus rapidement sur ce milieu que la très grande majorité des germes normaux de la bouche. On met les tubes à l'étuve à + 38° et on les examine 15 à 20 heures plus tard (fig. 118). S'ils sont vierges de colonies, la fausse membrane ne contenait

pas de *B. de Löffler* ; s'il existe des colonies, on les examine, on les réensemence. C'est ainsi qu'on isole facilement le microbe de la diphtérie.

Le *Gonocoque* pousse volontiers la gélose de WERTHEIM (p. 112) ; son isolement s'effectuera de préférence sur ce milieu.

Le *B. subtilis*, le *Vibron cholérique* poussent en voile à la surface du bouillon : une parcelle de ce voile réensemencée aura des chances de donner une culture pure. Le *Vibron cholérique* pousse même en six à dix heures dans une simple solution salée de peptone (p. 89), c'est-à-dire avant le développement de la grande majorité des microbes des selles. KOCH a utilisé cette propriété pour faire rapidement le diagnostic du choléra et isoler son vibron.

L'addition d'acide phénique (p. 106) à la gélatine empêche la pullulation des microbes liquéfiantes des eaux, et permet la

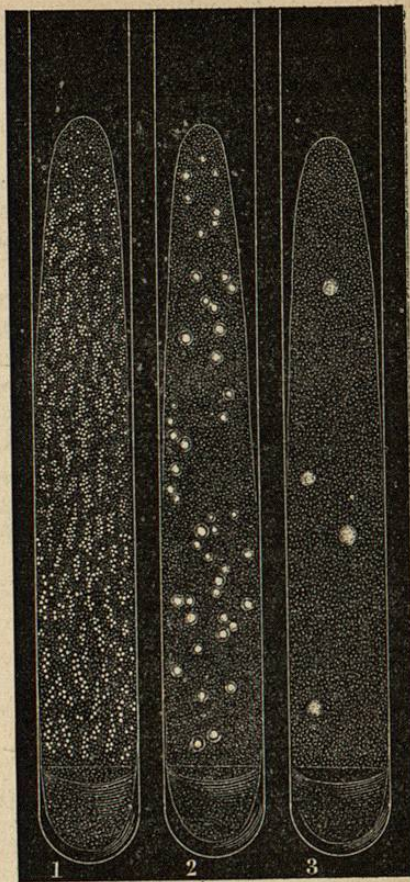


Fig. 118.

Isolement du *B. de Löffler* sur sérum.
(Voy. p. 634).

culture sur plaques d'Esmarch du *B. coli* et du *B. d'Eberth* qu'elles peuvent contenir (CHANTEMESSE et WIDAL¹).

La carotte est le milieu que préfère le champignon du Muguet (ROUX et LIROSSIER, VELLAT²). Le *Streptocoque* pousse très vite sur les milieux au touraillon (G. ROUX, CHATIN³).

Le *Bacille de la tuberculose*, au sortir des ganglions du cobaye, doit être isolé sur sérum gélifié et ne pousse sur gélose glycinée qu'après un acclimatement à ce milieu.

Le même bacille, contenu dans les épanchements pleuraux, végète directement si on l'ensemence sur *sang gélosé* (voy. p. 112).

Est-il besoin de rappeler la préférence qu'a l'*Aspergillus niger* pour le liquide de RAULIN (p. 80), et sa sensibilité aux moindres modifications de ce liquide, même à celles aussi insensibles que l'exposition dans un vase d'argent? Mais nous entrerions dans le domaine des champignons.

¹ CHANTEMESSE et WIDAL, *Recherches sur le bacille typhique*, Arch. de physiologie, 1887, p. 252.

² ROUX et LIROSSIER, *Arch. de médecine expérimentale*, 1890. — VELLAT. Thèse de Lyon, 1892.

³ ROUX, Soc. de Biologie, 1889. — CHATIN. Thèse de Lyon, 1893.

CHAPITRE VI

CULTURE ET ISOLEMENT DES ANAÉROBIES

La découverte des *microbes anaérobies*, faite par PASTEUR¹, en 1861, fut une véritable révolution scientifique. On croyait jusqu'alors que tout être vivant avait besoin d'oxygène libre pour vivre et pulluler. PASTEUR montra qu'à côté des *microbes aérobies*, c'est-à-dire exigeant pour vivre une grande quantité d'oxygène libre, il y avait des *microbes anaérobies* pour lesquels l'oxygène est un véritable poison, microbes ne poussant que dans un milieu complètement dépourvu de ce gaz. Les premiers anaérobies connus furent le *Vibrion butyrique* et celui du lactate de chaux. PASTEUR décrivit aussi des *microbes facultatifs* pouvant indifféremment végéter à l'air libre ou dans une atmosphère privée d'oxygène.

Presque tous les microbes aérobies sont facultatifs. Voici un tableau comprenant les nomenclatures des principaux types de ces trois classes de microbes :

M. AÉROBIES	M. FACULTATIFS	M. ANAÉROBIES
B. anthracis.	Staphylocoque pyogène.	Bacille de Nicolaïer.
B. de la morve, etc.	Vibrion cholérique.	Vibrion septique.
	Streptocoque pyogène.	Bacillus Chauvæi.
	Bacille de Löffler.	Vibrion butyrique, etc.
	Bacille d'Eberth.	
	B. pyocyanique, etc.	

¹ PASTEUR, *Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre*. C. R. Ac. des sciences 1861, p. 344.