

culture sur plaques d'Esmarch du *B. coli* et du *B. d'Eberth* qu'elles peuvent contenir (CHANTEMESSE et WIDAL<sup>1</sup>).

La carotte est le milieu que préfère le champignon du Muguet (ROUX et LIROSSIER, VELLAT<sup>2</sup>). Le *Streptocoque* pousse très vite sur les milieux au touraillon (G. ROUX, CHATIN<sup>3</sup>).

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

Le même bacille, contenu dans les épanchements pleu-raux, 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.

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

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

<sup>3</sup> ROUX, Soc. de Biologie, 1889. — CHATIN. Thèse de Lyon, 1893.

## CHAPITRE VI

## CULTURE ET ISOLEMENT DES ANAÉROBIES

La découverte des *microbes anaérobies*, faite par PASTEUR<sup>1</sup>, 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 pyo-gène.	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.	

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



On voit, par ce tableau, que les microbes anaérobies actuellement connus tiennent déjà une grande place dans la pathologie infectieuse ; ils sont les agents des maladies les plus redoutables (tétanos, gangrène gazeuse, charbon symptomatique, pleurésies putrides, abcès gangreneux, etc.). (Voy. p. 799 la description de nombre d'anaérobies.) Ils sont d'ailleurs très répandus dans la nature. La plupart se reproduisent par des spores extrêmement résistantes. Il suffira pour s'en procurer d'inoculer sous la peau d'un cobaye un peu de terre végétale, de vase chauffée à  $+ 100^{\circ}$  pendant dix minutes (pour la débarrasser des microbes vulgaires). Le cobaye mourra, en vingt-quatre ou trente-six heures, de septicémie gangreneuse ou de tétanos. L'ensemencement de la sérosité péritonéale donnera des cultures pures de *Vibrion septique* dans le premier cas ; l'ensemencement du liquide de la plaie, dans le second, fournira aussi des cultures de *Bacille de Nicolaïer*, mais le plus souvent impures. On peut aussi se procurer du *Bacillus butyricus* en immergeant un haricot dans un tube à essai rempli aux  $3/4$  de gélose bouillante qu'on met à l'étuve à  $+ 38^{\circ}$ .

En résumé : la gravité des accidents qu'ils engendrent, leur fréquence dans la nature, la résistance de leurs spores placent les anaérobies au premier rang des microbes pathogènes. Leurs exigences biologiques imposent une technique spéciale sur laquelle nous allons longuement nous appesantir. Nous supposons d'abord l'élève en possession d'une culture pure d'un anaérobie pour décrire les *procédés habituels de culture de ces microbes* ; nous étudierons ensuite les *méthodes d'isolement des anaérobies*.

Une question théorique se pose avant d'aller plus avant dans ce chapitre : l'anaérobie vrai se passe-t-il réellement d'oxygène ou l'emprunte-t-il aux substances du milieu nutritif qui en contiennent ? Craint-il seulement l'oxygène libre ? On admet actuellement qu'un microbe peut vivre et se multiplier sans fixer aucune molécule d'oxygène. Il n'en est pas moins vrai que beaucoup d'anaérobies utilisent l'oxygène des substances nutritives qu'ils dédoublent par fermentation.

Il est facile de mettre en relief la différence dans les besoins

en oxygène de différents microbes : il suffit pour cela d'examiner les cultures par piqûre sur un milieu solide d'un grand nombre de microbes. Le *Bacille du charbon*, par exemple (fig. 119, a) qui a beaucoup d'affinité pour l'oxygène, poussera abondamment à la surface de la gélose, et la vigueur de la culture diminuera progressivement le long du sillon de la piqûre à mesure que celui-ci s'éloignera de l'atmosphère. Le *Bacille de la septicémie de la souris*, au contraire, est anaérobie ; il ne se développera pas à la surface de l'agar, mais bien dans la profondeur de celui-ci et d'autant plus abondamment qu'on s'éloignera de l'atmosphère du tube (fig. 119, b.)

Ces deux colonies représentent deux cônes : le cône du microbe aérobie a la pointe dirigée en bas, et celui de l'anaérobie l'a dirigée en haut. La colonie du microbe facultatif a la forme d'un cylindre (fig. 119, c).

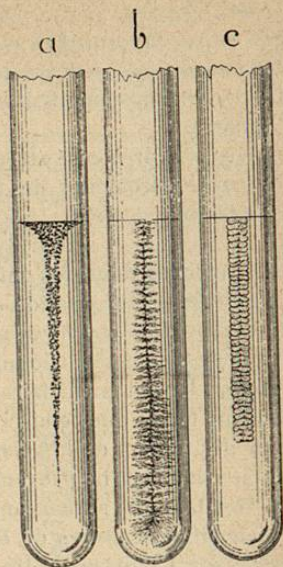


Fig. 119.

Cultures de microbes sur gélose.

a, culture d'aérobie. — b, culture d'anaérobie — c, culture de facultatif.

## § 1. — CULTURE DES ANAÉROBIES

Nous supposons qu'on veuille propager une culture pure de microbe anaérobie déjà isolé.

**1° Cultures dans les couches profondes des milieux exposés à l'air.** — Certains anaérobies poussent dans les couches inférieures des *liquides* nutritifs qui remplissent des



réipients suffisamment étroits et profonds (éprouvettes, tubes à essai, flacons, etc.), sans qu'il soit besoin de faire le vide. Ce n'est pas un procédé à employer; l'expérience prouve simplement que tous les anaérobies ne sont pas également exigeants et que certains supportent la présence d'une quantité notable d'oxygène.

LIBORIUS a préconisé (1886) la culture des anaérobies dans les couches profondes des milieux solides et particulièrement de la gélose peptonée.

**2° Cultures dans des milieux aérés mais isolés de l'atmosphère.** — Un procédé de culture assez employé consiste à recouvrir d'une couche de pétrole ou d'huile stérilisée de deux centimètres de hauteur le milieu nutritif liquide ou solideensemencé. Il vaut mieux faire stériliser l'huile dans le récipient en même temps que celui-ci, vide ou déjà chargé du bouillon, de la gélatine ou de la gélose; ces milieux privés d'air pendant le chauffage ne peuvent le reprendre pendant le refroidissement, l'huile surnageant à la surface. On obtiendra ainsi facilement des cultures de *Bacille de Nicolaïer*, de *Vibrion cholérique*, etc. L'huile même très pure est parfois émulsionnée au cours de la végétation de certains microbes, tels que le *Vibrion cholérique*; elle n'est cependant pas dédoublée, il n'y a pas production de glycérine (J. COURMONT et DOYON).

Il est préférable d'employer l'huile de vaseline.

KOCH a proposé de recouvrir la surface de la gélatine coulée sur plaques d'une mince plaque de verre ou de mica qu'on dépose sur la gélatine encore molle. Ce procédé n'est plus employé.

**3° Cultures dans des récipients scellés à la lampe après ébullition des milieux nutritifs.** — L'ébullition chasse l'air contenu dans les milieux nutritifs; on peut alors fermer le récipient avant le refroidissement. Il n'y a aucun inconvénient à porter pendant quelques minutes à l'ébullition du bouillonensemencé avec des anaérobies à spores très résistantes tels que le *Bacille de Nicolaïer* ou le *Vibrion septique*. On se sert pour

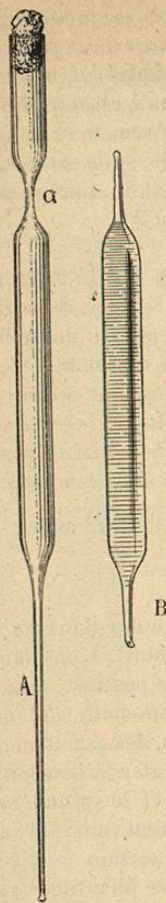


Fig. 120.

Pipette pour conserver les cultures anaérobies.

A, pipette vide. — B, pipette chargée et fermée.

cela de pipettes munies d'un étranglement (a) comme le montre la figure 120 (A), qui sont stérilisées à  $+ 150^{\circ}$  au four Pasteur. On chauffe le bouillon, la gélatine ou la géloseensemencés, et on aspire dans la pipette après avoir cassé et flambé la pointe. Dès que la substance nutritive a atteint l'étranglement (a), on met le doigt sur l'ouverture supérieure, on relève le tube dans une position oblique et on ferme à la lampe l'étranglement, puis la pointe. Le tube complètement plein est figuré en (B). Cette méthode est un

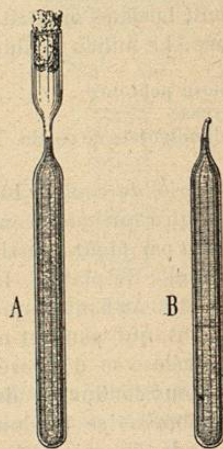


Fig. 121.

Tube à essai pour la culture des anaérobies.

A, tube rempli. — B, tube après la fermeture de l'étranglement à la lampe.

excellent moyen de conserver pendant de longs mois en bouil-



lon des cultures anaérobies *virulentes*, par exemple le *Bacille de Nicolaïer*. On peut remplir ces tubes avec de la gélatine ou de l'agar et les ensemercer ensuite par piqûre en cassant une pointe pour quelques instants. Des tubes à essai avec étranglement (fig. 121) remplis de bouillon, ensemençés et fermés à la lampe, même sans ébullition préalable, suffisent pour cultiver les anaérobies peu exigeants. On peut en somme combiner les méthodes 3° avec celles décrites à 2°.

4° Cultures sur des milieux exposés à l'air mais additionnés de substances très oxydables. — KITASATO et WEYL (1890) ont proposé d'ajouter à la gélose peptonée des substances très oxydables telles que : le formiate de soude, le sulfindigotate de soude, le pyrogallate de potasse, le chlorhydrate d'hydroxylamine, la résorcine, l'hydroquinone, etc. Dans le même but, LIBORIUS ajoutait à la gélose une certaine quantité de glycose. Le milieu le plus employé est ainsi fabriqué :

Gélose peptonée. . . . .	1 000 grammes.
Glycose . . . . .	20 —
Sulfindigotate de soude. . . . .	1 —

Cette gélose, de couleur bleu-noir, est coulée dans un tube à essai jusqu'à quelques centimètres du bord. L'ensemencement se fait par piqûre aussi profonde que possible, avec une longue aiguille de platine. Les tubes ensemençés sont mis à l'étuve à + 38°. Au bout de quelques heures, des gaz abondants se produisent, qui peuvent même faire sauter le bouchon de ouate. La gélose se décolore ; le glucose et le sulfindigotate s'oxydent sous l'influence du développement microbien (le même phénomène se produirait à la longue sans culture) et s'emparent de l'oxygène dissous ; le tube bleu noir passe au jaune foncé, l'indigo bleu s'étant transformé en indigo blanc.

On peut également se servir, dans le même but, de gélose ordinaire additionnée de 0,5 p. 1000, de formiate de soude, ou colorée en violet par quelques gouttes de teinture de tournesol.

5° Cultures dans une atmosphère confinée dont l'oxygène est absorbé par des substances très oxydables. — La substance oxydable n'est plus mélangée au milieu nutritif, comme dans la méthode précédente, mais est déposée autour de lui dans l'atmosphère restreint d'un tube clos qui enveloppe le tube à culture.

HANS BUCHNER (1889) fait absorber l'oxygène par l'acide

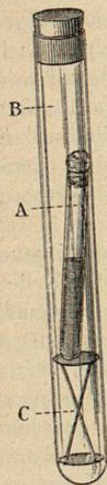


Fig. 122.

Appareil de H. BUCHNER.

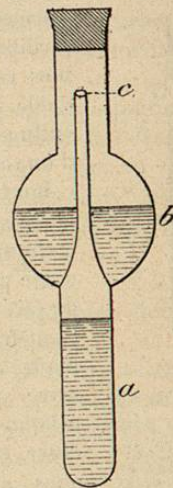


Fig. 123.

Appareil de TURRO.

pyrogallique (fig. 122). Le petit tube (A) chargé d'agar ensemençé avec l'anaérobie, bouché à la ouate, est soutenu dans le grand tube (B) par un support en fil de fer (C) ou un ressort à boudin. Une solution alcaline d'acide pyrogallique (1 grammé d'acide pyrogallique dans 10 centimètres cubes d'une solution de potasse caustique à 40 p. 100) est versée dans le tube (B) qui est fermé à frottement par un bouchon de caoutchouc. Le tout est mis dans une étuve à + 30°. De légères secousses imprimées fréquemment au tube activent



l'absorption de l'oxygène. BUCHNER a pu cultiver ainsi le *Vibron septique*.

TURRO (1902) emploie le dispositif représenté figure 123. Il s'agit d'un tube à culture (a) dont le col (c) est entouré d'un ballon (b) destiné à contenir l'acide pyrogallique.

6° Cultures dans des milieux dont l'oxygène est absorbé par des microbes aérobies. — L'utilisation de

l'oxygène libre par les microbes aérobies peut faciliter la culture des anaérobies; les aérobies remplissent le rôle de substance oxydable. Dès 1886, LIBORIUS avait obtenu des cultures anaérobies sur gélatine recouverte d'une culture des microbes de la putréfaction.

ROUX (1887) a institué l'expérience de la façon suivante :

On met dans un tube à essai bouché à la ouate quelques centimètres cubes de gélose; on fait bouillir et refroidir rapidement dans l'eau froide. Onensemence l'anaérobie par piqûre aussitôt la solidification effectuée. On verse sur la gélose une petite quantité de gélatine liquide qu'on laisse également solidifier. On verse ensuite sur la gélatine quelques gouttes d'une culture d'aérobies, de *Bacillus subtilis* par exemple. On ferme le tube à la lampe et on dépose dans l'étuve à

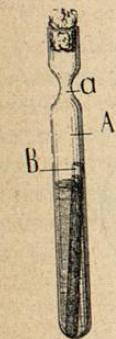


Fig. 124.  
Dispositif de SALOMONSEN pour la culture des anaérobies en présence d'un aérobie.

+ 38°. L'aérobies consomme tout l'oxygène et l'anaérobies se développe bien. Il faut casser le tube pour prélever de la semence anaérobies non contaminée par le *B. subtilis*.

Cet inconvénient n'existe pas avec le dispositif représenté figure 124 et dû à SALOMONSEN. Le petit tube (A) chargé de gélose est destiné à l'anaérobies; le grand (B), chargé de bouillon, estensemencé avec un aérobie. On ferme à la lampe en (a)

J. COURMONT et NICOLAS<sup>1</sup> sont arrivés, les premiers, à cultiver un

anaérobies (le *Vibron septique*) à l'air libre, dans du bouillon étalé en couche mince mais contenant en même temps un microbeaérobies (un diplocoque) qui absorbait l'oxygène (le bouillon en était dépourvu malgré sa grande surface d'exposition à l'air). Toutes les cultures mixtes d'un aérobie et d'un anaérobies ne donnent pas ce résultat: ainsi le mélange du *Vibron septique* et du *Staphylocoque pyogène* ne laisse pas pousser l'anaérobies parce que le staphylocoque sécrète des substances solubles qui entravent la pullulation du *Vibron septique*. Ces expériences expliquent bien la végétation possible des anaérobies dans la nature.

Toutes les méthodes précédentes ne sont pas essentiellement pratiques; la plupart constituent simplement des expériences curieuses<sup>1</sup>. Celles que nous allons décrire sont au contraire journellement employées dans les laboratoires; elles sont toutes basées sur l'extraction mécanique de l'oxygène des récipients destinés aux cultures d'anaérobies.

7° Cultures dans une atmosphère confinée dont l'air a été refoulé et remplacé par un gaz inerte. — Un appareil à faire le vide n'est pas indispensable pour chasser l'air d'un récipient à culture. Il peut être remplacé par le *refoulement de l'air* à l'aide d'un gaz inerte. WURTZ a proposé, en 1889, l'artifice suivant: on charge de gélose un tube à essai et on le bouche par un bouchon de caoutchouc muni de deux tubes de verre (A) et (B) (fig. 125). Le tube (A) effleure la gélose et est embranché sur un tube de caoutchouc qui amène du gaz d'éclairage. On fait passer le courant de gaz pendant cinq minutes en même temps qu'on fait bouillir la gélose à l'aide d'un bec Bunsen pour empêcher qu'elle ne s'imprègne de gaz. Au bout de cinq minutes on verse par le petit entonnoir (B) 1 ou 2 centimètres cubes de pétrole stérilisé. On enlève le bou-

gies sur la conservation et la végétation des anaérobies, Arch. de physiologie, juillet 1894.

<sup>1</sup> Voy. p. 606 l'utilisation de ce procédé pour obtenir en grand la culture du *B. de Nicolaïer* à l'air libre.



chon de caoutchouc et on le remplace par un tampon de ouate. Pour ensementer, 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 en verre (C) en rapport lui-même par un tuyau (D) avec une con-

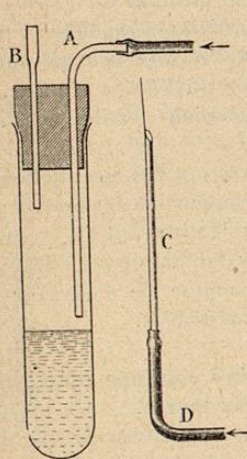


Fig. 125.

Appareil de Wurtz pour la culture des anaérobies dans un gaz inerte (le gaz d'éclairage).



Fig. 126.

Appareil de Roux pour la culture des anaérobies dans un gaz inerte.

duite de gaz qui reste ouverte pendant tout le temps de l'opération.

PASTEUR avait déjà employé l'acide carbonique dans le même but. Ce gaz, ainsi que le gaz d'éclairage, peuvent être nuisibles à la culture de plusieurs microbes (FRÄNKEL, KLADAKIS, 1890) et doivent donc être rejetés de la technique générale.

Roux a indiqué un procédé beaucoup plus simple de refoulement de l'air par un gaz inerte. 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 (fig. 126). On liquéfie

la gélatine dans un bain d'eau chaude, on fait pénétrer à travers la ouate jusqu'au fond de la gélatine un tube de petit calibre, une pipette courbée qui amène un courant de gaz privé d'air. Ce petit tube a été stérilisé ; il porte un tampon de coton pour filtrer le gaz à son arrivée. Lorsque le gaz a suffisamment barboté dans la gélatine, on soulève le tube à la surface de la gélatine qu'on laisse refroidir. Le gaz continue à passer. On ensemente par piqûre. On soulève le petit tube au-dessus de l'étranglement qu'on ferme à la lampe. Il n'y a pas d'air dans un tube ainsi préparé.

8° Cultures dans le vide obtenu par aspiration. — La méthode la plus employée et la plus commode consiste à faire le vide dans les récipients destinés à cultiver les anaérobies. C'est d'ailleurs la seule qui permette d'analyser les gaz produits par les anaérobies.

A. MACHINES PNEUMATIQUES. — Toutes les machines pneumatiques peuvent servir à faire le vide dans les récipients à cultures. Il sera utile d'intercaler sur le tube en caoutchouc qui relie le récipient à culture (A) à la chambre de l'appareil (B) un tube de verre en T (C), dont la branche inférieure sera munie d'un tube de caoutchouc (D) à parois suffisamment épaisses pour tenir le vide, et lui-même fixé à un autre tube de verre (E) long de 90 centimètres environ et plongeant dans un vase rempli de mercure (F) (fig. 127). Le tube (E) constitue un tube barométrique qui permettra d'apprécier la perfection du vide obtenu ; il servira aussi à introduire un gaz inerte dans le récipient à culture (A) (voir 9°). Il est facile de modifier ainsi soi-même une machine pneumatique quelconque.

La trompe à eau donne un vide moins parfait que la machine pneumatique, mais toujours suffisant pour cultiver les microbes les plus anaérobies. Nous nous servons d'une trompe, à enveloppe métallique, placée dans le sous-sol, et actionnée par l'eau d'un réservoir situé 19 mètres plus haut. La conduite d'eau passe par le laboratoire où elle est munie d'un robinet qui permet de mettre l'appareil en marche. Le tube tenant le



vide se branche en T sur un tube horizontal où s'insèrent plusieurs robinets munis de forts tubes de caoutchouc; il est surmonté d'un manomètre. On peut ainsi faire le vide en même

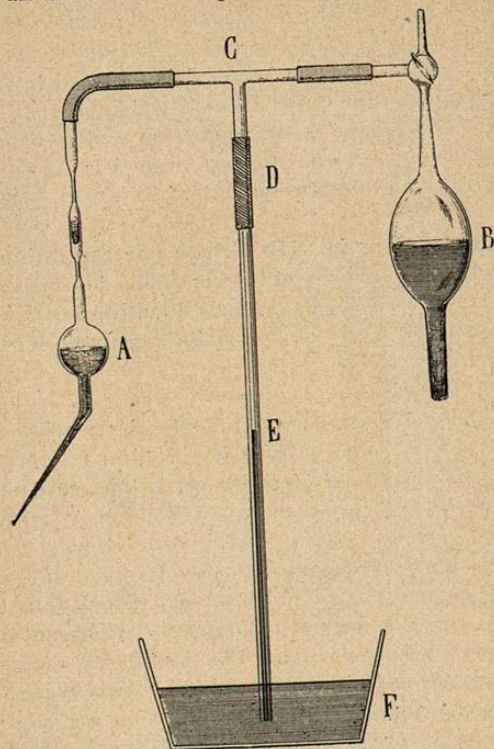


Fig. 127.

Adaptation de la machine pneumatique à la culture des anaérobies dans le vide ou dans un gaz inerte.

temps dans un grand nombre de récipients. Les deux extrémités sont reliées à des générateurs d'hydrogène; les deux robinets extrêmes sont à voie en T pour pouvoir faire pénétrer l'hydrogène après le vide obtenu.

Nous avons aussi des trompes métalliques adaptées directement aux robinets des laboratoires. Pour augmenter leur puissance (faible en raison du voisinage du réservoir du toit), nous avons ajusté, à la partie inférieure de la trompe, un tube en plomb de vue, de 0<sup>m</sup>,01 de diamètre qui descend jusque dans le sous-sol.

Certaines installations (fig. 128) ont un récipient de sûreté (R)

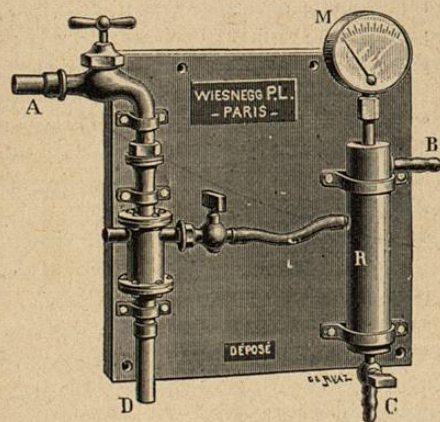


Fig. 128. — Trompe avec récipient de sûreté R, C.

interposé entre la trompe et le tube à vide (B), pour éviter les refoulements d'eau dans ce dernier. On peut y suppléer en plaçant de suite après la trompe un flacon à deux tubulures.

**B. RÉCIPIENTS.** — On peut se dispenser d'avoir des récipients spéciaux pour les cultures dans le vide. Il suffirait de placer ceux qui ont été décrits pour les cultures aérobies sous des cloches à vide ordinaires. On compléterait le vide pneumatique obtenu, par l'addition d'un vase contenant un milieu avide d'oxygène, l'acide pyrogallique par exemple.

Le grand inconvénient de ce dispositif tient dans la difficulté de transporter la cloche dans l'étuve et de trouver une sub-



stance d'ajutage qui maintienne la fermeture hermétique des joints à + 37°.

On peut aussi utiliser l'étuve à vide de Wiesneeg, représentée page 843, figure 371.

Aussi préfère-t-on faire directement le vide dans les récipients eux-mêmes. Les récipients destinés aux cultures qui pousseront dans le vide, doivent remplir une condition essentielle : ils auront des parois suffisamment épaisses et des ajutages assez parfaits pour pouvoir tenir le vide sans se briser.

a. *Récipients à cultures anaérobies liquides.* — On se servait autrefois du tube Pasteur simple ou double (fig. 9). Nous employons continuellement la pipette à boule<sup>1</sup> (fig. 129) munie de plusieurs rétrécissements séparant deux ou trois bouchons de ouate. Ce petit appareil peut servir autant de fois qu'il possède de rétrécissements et de tampons ; il est très commode. La forme courbée de sa pointe effilée a cependant l'inconvénient de le rendre encombrant dans une étuve et par conséquent fragile. Il est bon d'avoir dans la chambre étuve une petite caisse dans laquelle sont placées (la pointe effilée en bas, pour que la culture ne touche pas le coton) toutes les pipettes à boule. Nous avons fait construire une planche à supports, spéciale pour cet usage.

Pour charger un tube Pasteur ou une pipette à

boule (préalablement stérilisés au four Pasteur ou à l'autoclave), il faut d'abord ensemen-

Fig. 129.  
Pipette à boule pour la culture des anaérobies en bouillon.

<sup>1</sup> Il faut nécessairement introduire les tampons de ouate successivement avant de faire les rétrécissements suivants. C'est donc le fabricant de pipettes qui doit placer le coton.

liquide nutritif dans un petit ballon ordinaire comme s'il s'agissait d'une culture aérobie. On casse alors avec une pince l'extrémité du tube effilé<sup>1</sup>, on flambe avec soin la surface extérieure de ce dernier sur une hauteur de plusieurs centimètres, on attend quelques secondes le refroidissement, et on plonge le tube ouvert dans le petit ballon de bouillon ensemené. On aspire avec la bouche jusqu'à ce que le liquide ait rempli les deux tiers de la boule ou la moitié du tube Pasteur ; on applique alors le doigt sur l'orifice supérieur, on retire l'appareil, on l'incline, la pointe dirigée vers le haut, de façon à ce que l'extrémité du tube soit privée de liquide, et on ferme de nouveau à la lampe la pointe du tube effilé. On adapte alors le tube supérieur au tube de caoutchouc de la machine pneumatique ou de la trompe, et on applique sur cet ajutage une ligature bien serrée au moyen d'une petite lanière coupée dans une bande plate de caoutchouc. Un peu de vaseline facilitera l'entrée du tube de verre dans le tube de caoutchouc lorsque les parois de ce dernier seront trop rigides. Il va sans dire que l'orifice supérieur des tubes Pasteur ou de la pipette à boule doit avoir des bords plutôt rentrants qu'évasés ; un léger rétrécissement facilite la ligature.

L'appareil ainsi mis en place, on fait le vide. Bientôt (s'il n'y a pas de fissures dans l'ajutage), de nombreuses bulles d'air se détachent des parois du tube et viennent éclater à la surface du bouillon. Le liquide nutritif se purge donc d'air, par cette méthode, sans qu'on ait besoin d'avoir recours à l'ébullition à + 100°. On peut activer l'opération en chauffant *très légèrement* le liquide ; il suffit pour cela de serrer la boule dans la main ; les bulles d'air se précipitent avec rapidité ; ce petit artifice est souvent indispensable pour dilater et chasser la bulle d'air qui se trouve presque toujours à l'extrémité effilée de la pipette à boule ; le liquide prend sa place et choque le fond du tube avec un bruit perceptible qui indique le vide. Lorsque celui-ci

<sup>1</sup> Il est bon, lorsqu'on se sert de tubes Pasteur, d'écartier la branche effilée du corps du tube, qui l'empêcherait de plonger dans un ballon. Cela est très simple en ramollissant la soudure à la lampe d'émailleur.



est aussi parfait que peut le fournir l'appareil employé, on scelle à la lampe le rétrécissement le plus rapproché de la machine pneumatique et la culture est prête à être mise à l'étuve. Il faut avoir soin de fermer le robinet qui commande le récipient, avant de sceller ce dernier. Le rétrécissement sera étiré avec une rapidité suffisante pour empêcher l'air atmosphérique de crever le verre et d'envahir le tube; il se produit presque toujours une petite dépression en ombilic qui témoigne de la réalité du vide.

Il doit toujours rester un tampon de coton dans le tube Pasteur ou dans la pipette pour permettre de réensemencer plus tard avec pureté la culture obtenue. Supposons que l'élève veuille propager une culture anaérobie ayant végété en pipette à boule: 1° Il faut d'abord briser avec une pince l'extrémité scellée qui avoisine le tampon de coton; l'air se précipite dans le tube; mais, filtré à travers le coton, retenu par l'étranglement, il ne peut contaminer le bouillon. Ce premier temps est indispensable; si on ouvrait d'abord l'extrémité chargée de liquide, l'air pénétrerait directement dans celui-ci et le souillerait de tous les germes qu'il contient, en même temps qu'il le projetterait contre le coton; 2° Le second temps consiste à déboucher un petit ballon stérilisé qu'on place dans un cristalliseur; 3° Le troisième temps est le plus délicat: il faut stériliser le tube effilé jusqu'au coude, en le passant plusieurs fois dans la flamme d'un bec Bunsen, tout en ayant soin de ne pas trop chauffer le liquide de culture dont les microbes ne doivent être ni tués, ni atténués. On casse alors la pointe avec une pince flambée, et on l'introduit immédiatement dans le petit ballon qui reçoit toute la culture; 4° L'ensemencement se fait alors comme pour les cultures aérobies, et ainsi de suite. Le cristalliseur est destiné à recevoir les quelques gouttes de culture qui peuvent tomber de la pipette avant son introduction dans le ballon et qui souilleraient le laboratoire; la stérilisation du tube jusqu'au coude est utile dans les cas où, la pipette étant tenue la pointe en l'air, une goutte de culture viendrait couler sur la surface extérieure jusqu'au coude qui est la partie la plus déclive, et retomberait ensuite dans le petit

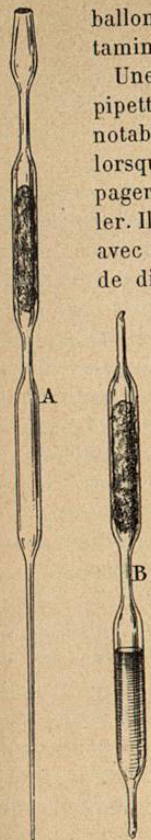


Fig. 130.  
Pipette pour cultiver les anaérobies dans le vide.

A, pipette prête à servir. — B, pipette contenant la culture dans le vide.

ballon; de cette façon, la goutte ne peut être contaminée.

Une simple pipette est plus commode que la pipette à boule, si on n'a pas besoin d'une quantité notable de culture, par exemple lorsqu'on veut simplement propager un anaérobie sans l'inoculer. Il faut alors faire des pipettes avec des tubes de 10 millimètres de diamètre en verre un peu

fort. La manœuvre est la même. La figure 130 nous dispense de toute description. La pipette simple peut aisément se faire au laboratoire; elle est en outre moins friable à l'étuve, si on a soin de la fermer aussi près que possible du corps.

On peut faire des cultures liquides dans le vide avec un tube à essai quelconque (fig. 131, A), pourvu que ses parois soient suffisamment épaisses. Il est stérilisé avec un tampon de

ouate, chargé de bouillon et ensemencé. On remplace alors le tampon de ouate par un bouchon de caoutchouc (C) percé d'un orifice central, lequel donne passage à un tube de verre (B) muni d'un tampon de ouate situé entre deux rétrécissements. Le bouchon de caoutchouc a été stérilisé dans la solution de sublimé à 1 p. 100; le tube de verre a été



Fig. 131.

Dispositif pour les cultures anaérobies en bouillon dans des tubes à essai.

Le tube B est scellé, le vide ayant été fait.



stérilisé par la chaleur. La fermeture est rendue hermétique par un vernissage à la gutta-percha (dissoute dans le chloroforme) ou au moyen de cire à cacheter. On opère alors exactement comme avec un tube Pasteur ou une pipette à boule, et on ferme le tube de verre à la lampe.



Fig. 132.

Grand flacon disposé pour la culture en bouillon d'un anaérobie.

Les dispositifs précédents ne permettent pas d'obtenir des cultures liquides en grandes quantités, comme cela est nécessaire dans certains cas (exemple: la préparation des toxines du *Bacille de Nicolaïer* en vue de l'immunisation des grands animaux pour la récolte du sérum antitoxique). On se servira alors de grands flacons de un ou deux litres (fig. 132). Un bouchon en caoutchouc (b) livre passage à un tube de verre (c) présentant deux étranglements entre lesquels est, pour plus de sûreté d'asepsie lors de l'ouverture, un tampon d'ouate. Un second tampon d'ouate (a) volumineux ferme le goulot au-dessous du bouchon et suffirait à filtrer l'air de rentrée, lors de l'ouverture. Les joints du bouchon sont enduits de cire d'Espagne. Les temps de l'opération sont exactement les mêmes que pour le tube à

essai fermé avec un bouchon de caoutchouc. Le tube (c) sert à faire le vide et est fermé à la lampe.

J'ai fait construire, chez Alvergniat, trois récipients en verre destinés à obtenir de grandes cultures liquides, ou à contenir plusieurs récipients ordinaires, ou à conserver des toxines dans le vide. Je voulais pouvoir constater journellement l'existence du vide, au moyen du manomètre, et pouvoir compléter ce vide, sans démonter l'appareil; je voulais pouvoir prélever des toxines et refaire immédiatement le vide. Il fallait, pour cela, des récipients tout en verre,

munis de manomètres et de robinets à vide en verre rodé.

Je ne décrirai ces récipients que très rapidement. Ils sont fragiles, délicats à manier, et ne peuvent être mis entre les mains des élèves.

Le premier (fig. 133) est un flacon de 2 litres (A), surmonté d'un bouchon en verre rodé (B). Le goulot du flacon dépasse le bouchon, formant un petit entonnoir (C). Le bouchon est creux et donne accès à un tube recourbé (D) muni d'un manomètre (M) et d'un robinet à vide (E), lequel est surmonté d'un petit entonnoir et est fermé en bas par un petit réservoir (G). Le récipient sert aux cultures liquides en grand. On stérilise le flacon à part, avec le liquide nutritif, en recouvrant l'orifice par un capuchon de papier à filtrer. Onensemence. On adapte le bouchon (B), préalablement flambé et enduit d'un des corps gras isolants, employés en physique à cet usage (cire et manne par exemple). La cavité du bouchon est remplie par un tampon de coton de verre (b) retenu par une saillie (c) du bouchon. On remplit de mercure les entonnoirs (C) et (E). On adapte l'extrémité de (D) à un appareil pneumatique. On ferme le robinet (E) et on met à l'étuve. Si le manomètre indique l'affaiblissement du vide, on recommencera la manœuvre.

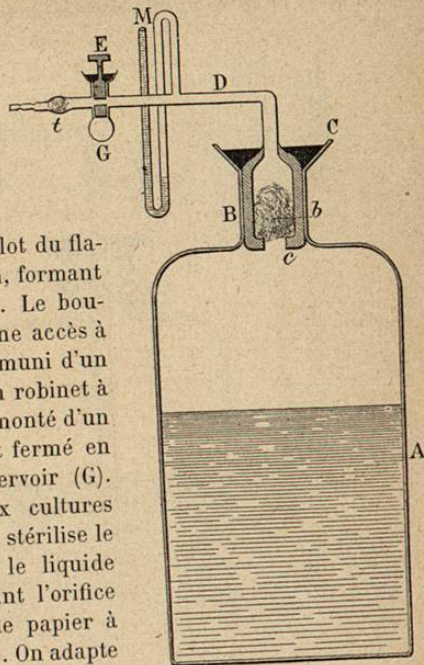


Fig. 133.

Récipient pour les cultures anaérobies, avec manomètre.

Le second (fig. 134) est destiné à conserver les toxines dans