

le vide. Le séjour dans la glacière rend le vide beaucoup plus facile à conserver. La figure dispense d'une longue description. C'est l'appareil précédent avec en plus, un tube (T) plon-

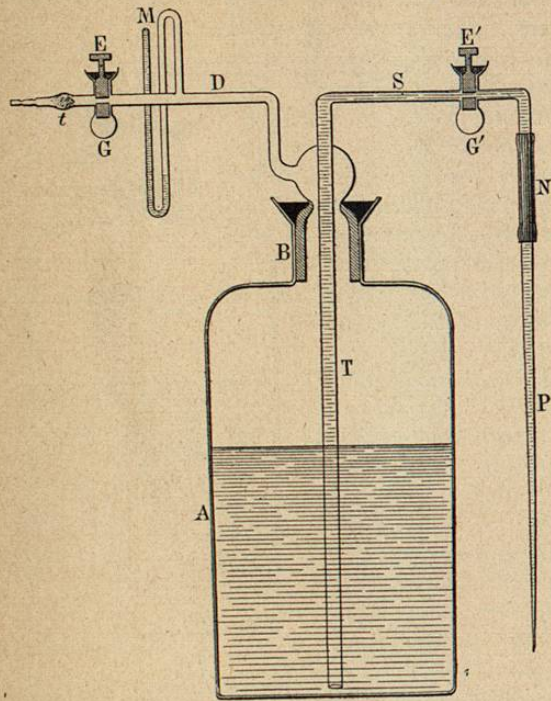


Fig. 134.

Récipient pour conserver les toxines dans le vide, avec manomètre.

geant jusqu'au fond dans le liquide, et une seconde branche (S), munie d'un robinet (E'), et à laquelle on peut adapter un tube de caoutchouc (N) muni d'une pipette en verre (P). On stérilise l'appareil, en entier, y compris le bouchon, on graisse les robinets, on remplit les entonnoirs de mercure. On ouvre les deux robinets et on adapte l'extrémité du tube (S) au

caoutchouc qui part de la tétine de la bougie à filtration (p. 63 fig. 48). L'opération terminée on enlève ce caoutchouc et on le remplace par l'ajutage (N). On fait le vide par (D), on ferme les deux robinets. On met à la glacière. Quand on veut prélever de la toxine, on ouvre successivement les deux robi-

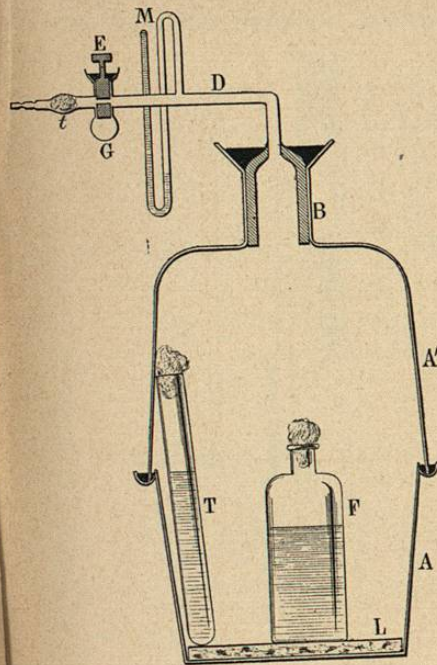


Fig. 135.

Cloche pour maintenir dans le vide des récipients ordinaires (T, F). L = liège.

L'ajutage du couvercle A' sur le bas A est mal représenté. Il est, en réalité, constitué par 2 anneaux rodés, comme dans les cloches ordinaires à vide.

nets (E) et (E'). L'air est filtré par le tampon de ouate (t), on casse la pipette (P); on souffle par (D); on recueille la quantité voulue de toxine; on referme la pipette; on refait le vide.

Le troisième (fig. 133) est une espèce de cloche destinée à contenir plusieurs cultures.



Fig. 136.

Dispositif pour les cultures anaérobies sur gélatine dans des tubes à essai.



b. *Récipients à cultures anaérobies solides.* — Ils sont identiques pour la gélatine, la gélose ou le sérum. Nous nous servons habituellement d'un *simple tube à essai* (fig. 136, A) muni d'un bouchon de caoutchouc (C) auquel est adapté un

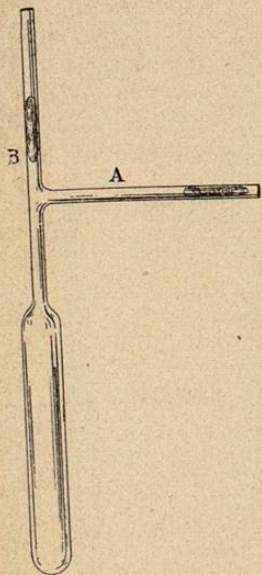


Fig. 137.

*Tube de Roux* pour la culture des anaérobies sur milieu solide.

tube de verre à deux rétrécissements (B) bouché, à la ouate, comme il vient d'être dit (p. 199), pour les cultures liquides. On enduit le bouchon de cire à cacheter ou de gutta-percha dissoute dans le chloroforme ; on fait le vide et on ferme à la lampe (fig. 136). Ce procédé est simple et économique.

Le *tube de Roux* (fig. 137) est un tube à essai surmonté d'un tube plus étroit (B) muni d'une branche latérale (A) ; deux tampons de ouate ferment les orifices.

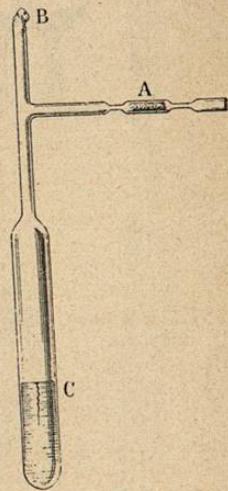


Fig. 138.

Le *tube de Roux* de la figure 137, au moment de faire le vide.

Après stérilisation au four, ce tube est chargé de gélatine jusqu'au quart inférieur avec un *entonnoir capillaire* ; on replace le tampon supérieur et on stérilise à la chaleur humide comme toute gélatine. On ensemece par piqûre à

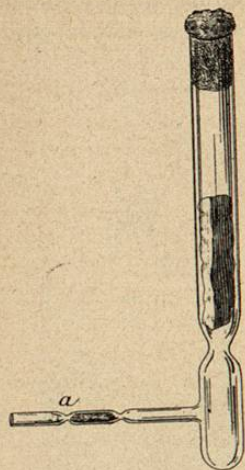


Fig. 139.

*Tube de Roux* pour culture des anaérobies sur pomme de terre.

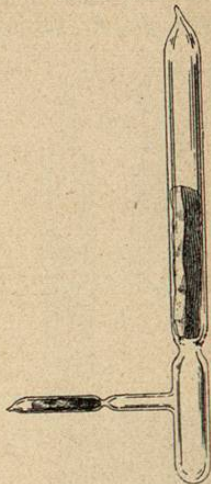


Fig. 140.

*Tube de Roux* contenant une culture sur pomme de terre dans le vide.

travers le tube (B) et on le ferme à la lampe (fig. 138). On fait alors deux étranglements autour du tampon du tube (A) qu'on adapte à la machine à faire le vide. Celui-ci fait, on ferme à la lampe. Nous préférons le simple tube à essai fermé par un bouchon de caoutchouc, lorsqu'on ne veut pas faire circuler le gaz inerte.

Pour faire des cultures anaérobies sur *pomme de terre*, on peut encore se servir d'un gros tube à essai disposé comme dans les cas précédents. Roux soude à son tube à pomme de terre, au-dessous de l'étranglement, une branche latérale (a) avec un tampon de ouate entre deux rétrécissements (fig. 139).



On ensemece la pomme de terre, on ferme à la lampe la partie supérieure, on fait le vide par la branche latérale qu'on ferme aussi (fig. 140).

9<sup>o</sup> Cultures dans le vide comblé par un gaz inerte. — Les méthodes de culture où le vide est obtenu par une

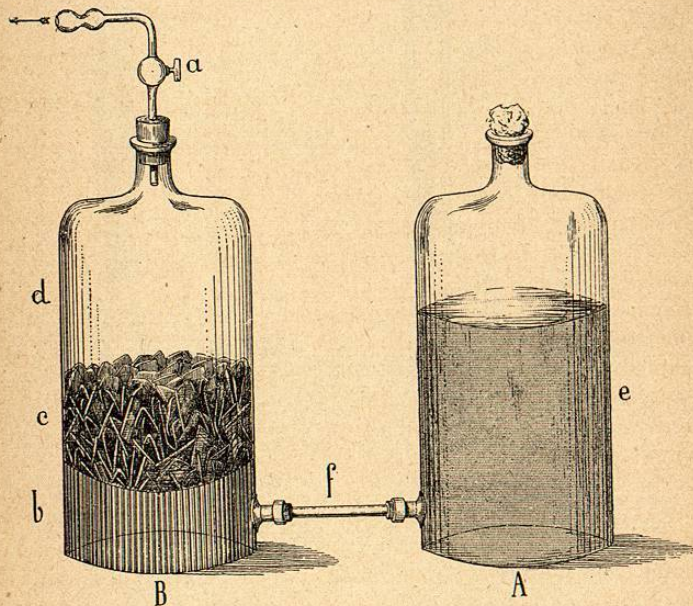


Fig. 141.

*Gazomètre à hydrogène.*

machine pneumatique, sont très largement suffisantes dans l'immense majorité des cas. Cependant les milieux solides conservent une assez grande provision d'air qui peut nuire au développement de certains microbes ; il est recommandé de chasser cet air, avant solidification, et par conséquent avant l'ensemencement, au moyen du barbotage d'un gaz

inerte ; c'est le refoulement combiné avec l'aspiration mécanique. On peut ainsi arriver à faire le vide avec des appareils assez imparfaits. On se servira toujours d'hydrogène comme gaz inerte ; l'acide carbonique, le gaz d'éclairage pouvant nuire au développement microbien.

Le gazomètre à hydrogène le plus simple est le suivant : deux grands flacons de Mariotte (fig. 141) sont unis (f) par leur tubulure inférieure de façon à constituer un récipient en U étranglé à sa partie inférieure. Le flacon (A) n'est pas bouché ; le flacon (B) est muni à sa partie supérieure d'un bouchon de caoutchouc percé d'un orifice livrant passage à un robinet (a). Au fond du flacon (B) sont rangés verticalement, et se touchant tous, des fragments de tube de verre plein (agitateurs) de 10 centimètres de hauteur environ (b) ; sur eux reposent les fragments de limaille de zinc (c). Le robinet (a) étant fermé, on remplit le flacon (A) avec de l'eau acidulée, avec de l'acide sulfurique ou chlorhydrique (une partie d'acide sulfurique à verser doucement dans

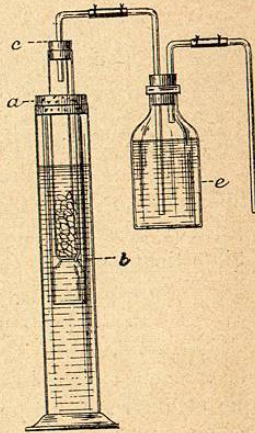


Fig. 142.

*Générateur d'hydrogène de Jorgensen.*

huit parties d'eau en remuant pendant qu'on verse). On ouvre le robinet (a) : le liquide se répartit dans les deux flacons qui sont à moitié pleins, d'après le principe de la répartition des liquides dans les vases communicants. On ferme le robinet (a). Le zinc trempant dans l'eau acidulée, l'hydrogène prend naissance et refoule l'eau au-dessous du zinc ; on ouvre alors le robinet pour purger d'air le flacon (B) ; le liquide remonte, engendre de l'hydrogène, et ainsi de suite à deux ou trois reprises. Lorsque le flacon (B) contient de l'hydrogène pur, l'appareil est prêt à fonctionner ; il suffira de mettre en rapport le tube qui part du robinet (a) avec le récipient à



culture où le vide a été fait pour que le gaz envahisse ce dernier. L'hydrogène se formera au fur et à mesure des besoins.

JORGENSEN a montré qu'on pouvait fabriquer très économiquement un générateur d'hydrogène (fig. 142). Un verre de lampe ordinaire est fixé à l'aide d'un bouchon perforé (a) dans une éprouvette à pied contenant la solution d'acide sulfurique ( $\frac{1}{8}$ ) avec deux gouttes d'une solution de chlorure de platine. En (b) est une lame de plomb perforée et couverte de mousseline pour supporter les petits morceaux de zinc. Le bouchon (c) en caoutchouc doit fermer très exactement. L'hydrogène passe dans un flacon laveur (e) contenant une solution alcaline d'acide pyrogallique (1 partie d'une solution aqueuse d'acide pyrogallique à 25 p. 100, mélangée à 10 parties d'une solution de potasse à 60 p. 100), pour enlever toute trace d'oxygène (SALOMONSEN).

Si on tient à avoir un hydrogène absolument pur, on le fera passer dans une série de flacons laveurs contenant eau, potasse, azotate d'argent, acide sulfurique, avant de l'envoyer dans le récipient à culture.

Le tube en T que nous avons adapté à la machine pneumatique ordinaire (p. 194) ou les deux robinets extrêmes de notre pompe (p. 195) serviront à amener le gaz, les robinets en cuivre de la trompe étant percés en T à trois voies. La manœuvre est la suivante : on fait le vide, puis on remplit le tube à culture avec un courant d'hydrogène ; on refait le vide et ainsi de suite quatre ou cinq fois. On peut laisser la culture dans l'hydrogène en fermant le tube pendant qu'il est plein de ce gaz.

Pour les cultures en milieu solide, il faut faire pénétrer (le faire barboter serait mieux) l'hydrogène sur la gélatine ou la gélose avant la solidification, et ensemencher, après celle-ci, dans le courant de gaz inerte. Supposons qu'on utilise le tube de Roux (fig. 137) : on le ferme en (B) après stérilisation de la gélatine. On fond la gélatine dans un bain-marie à une température aussi basse que possible, et on adapte (A) à la machine pneumatique. On fait pénétrer l'hydrogène à deux ou trois reprises en laissant entrer davantage de gaz toutes les

fois que l'ébullition devient trop tumultueuse. On laisse refroidir le tube en le maintenant en communication avec le gazomètre. Lorsque la gélatine est solidifiée, on élève le flacon à eau du gazomètre de façon à produire une légère pression dans l'intérieur du tube. On casse alors la pointe (B) dans la flamme d'un bec Bunsen ; le gaz sous pression s'échappe et empêche l'entrée de l'air. On en profite pour l'ensemencement avec une aiguille de platine pénétrant à travers l'orifice (B) qu'on referme immédiatement à la lampe. On ferme ensuite (A) après avoir chassé ou conservé l'hydrogène.

Si on tient à faire barboter le gaz dans la gélatine, il suffit d'avoir deux tubes pénétrant dans le récipient à culture, le tube d'arrivée plongeant au fond. Il en sera de même pour le bouillon. Ce dispositif est dessiné figure 132.

SALOMONSEN se sert, pour faire passer un courant d'hydrogène dans une culture liquide, du tube dessiné figure 143. La partie destinée à la culture mesure 10 centimètres de long sur 2 centimètres de diamètre. L'ensemencement se fait par le tube vertical, fermé à son extrémité par un bouchon tubulaire en caoutchouc (a) ; l'hydrogène a accès par le tube courbe, muni en (b) d'un tampon d'ouate. Des rétrécissements arrêtent les tampons. On ferme à la lampe dès qu'on arrête le passage du gaz.

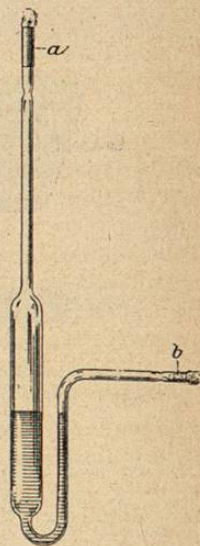


Fig. 143.  
Tube de Salomonsen pour la culture des anaérobies dans un gaz inerte.

**10° Cultures anaérobies sous le microscope.** — On a vu (ch. v, p. 156) comment on peut cultiver un microbe aérobie sous le microscope. Pour examiner le développement d'un anaérobie, on peut sceller simplement une goutte de culture



entre une lame et une lamelle avec du baume de Canada ou de la paraffine. On utilisera de préférence la *cellule de Geissler* (fig. 104) dans laquelle on fera passer de l'hydrogène et qu'on scellera aux deux bouts, ou mieux encore la *chambre à gaz* de RANVIER (fig. 144). C'est une chambre humide de Ranvier ordinaire avec deux tubulures latérales qui permettent de

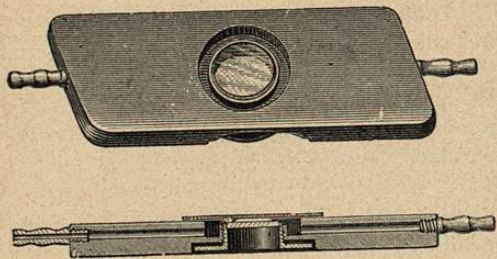


Fig. 144.

*Chambre humide de Ranvier pour la culture des anaérobies sous le microscope.*

faire circuler un gaz inerte dans la rigole qui entoure la goutte de culture. On pourrait se servir de la chambre humide de Ranvier ordinaire en mettant dans la rainure quelques gouttes d'un liquide réducteur (pyrogallate de potasse, formiate de soude, etc.).

On a également construit des platines chauffantes avec deux tubulures permettant d'amener un gaz inerte dans la cavité centrale.

## § 2. — ISOLEMENT DES ANAÉROBIES

Nous supposons maintenant qu'on veuille obtenir une culture pure d'un anaérobie mélangé à d'autres microbes dans le sol, dans un produit pathologique quelconque, dans une culture mixte, etc. Les méthodes d'*isolement* des anaérobies doivent être bien connues puisqu'elles seront la base de toute recherche concernant ces microbes.

**1° Isolement par la chaleur.** — La plupart des anaérobies pathogènes (*Vibrion septique*, *Bacille de Nicolaïer*, etc.) se reproduisent au moyen de spores très résistantes à la chaleur. On peut donc chauffer pendant 10 minutes à  $+ 100^{\circ}$  le mélange microbien, et tuer ainsi tous les autres microbes. PASTEUR a, le premier, indiqué ce procédé pour l'isolement du *Vibrion septique*, et KITASATO l'a appliqué à celui du *Bacille du tétanos*. Il va sans dire qu'on ne pourrait pas isoler l'un de l'autre ces deux anaérobies par cette méthode.

**2° Isolement par inoculation.** — On inocule à une espèce animale, très sensible au microbe anaérobie à isoler, le mélange qui le contient; après la mort de l'animal, on ensemeence aseptiquement les produits pathologiques de celui-ci. Exemple: on inocule sous la peau de la cuisse d'un cobaye une pincée de terre végétale, de terreau bien fumé, de vase. Le cobaye meurt, au bout de vingt-quatre ou trente-six heures, de septicémie gangréneuse. On ensemeence la sérosité péritonéale, on cultive dans le vide, et on obtient une culture pure de *Vibrion septique*. Pour le *Bacille tétanique* l'inoculation est moins utile, parce que le microbe reste cantonné dans la plaie avec les impuretés inoculées.

On fera bien de combiner la méthode de l'inoculation avec celle du chauffage, c'est-à-dire d'inoculer au cobaye des produits chauffés pendant dix minutes à  $+ 100^{\circ}$ , car certaines espèces facultatives, même non pathogènes, peuvent venir souiller les sérosités pathologiques et donner des cultures mixtes.

**3° Isolement par des cultures liquides.** — C'est la première méthode de PASTEUR, qui faisait le vide et lui substituait de l'acide carbonique dans des milieux liquides. Nous n'entreons pas dans de grands détails, car elle est facile à concevoir. On opère exactement comme pour les cultures aérobies, (voir p. 167), c'est-à-dire qu'on fait un certain nombre de dilutions et on répartit le liquide dilué par petites quantités dans un très grand nombre de récipients. Ces derniers, au lieu d'être



de simples ballons ou tubes à essai, seront les tubes décrits plus haut pour la culture des anaérobies en milieux liquides (tube Pasteur, pipette, tube de Salomonsen, etc., p. 193 et suivantes). On fait le vide, avec ou sans refoulement par l'hydrogène, et on met à l'étuve à  $+ 38^{\circ}$ . On examine alors les tubes qui se sont troublés. On contrôle la pureté de la culture obtenue par une culture en tube de gélatine enroulée dans le vide, par l'ensemencement à l'air qui doit rester stérile à moins que l'anaérobie soit facultatif, par l'inoculation, par l'examen microscopique, et, au besoin, par une nouvelle série de dilutions.

L'obligation de faire le vide dans un grand nombre de tubes rend l'isolement des anaérobies en milieux liquides très long, et, par conséquent, moins pratique que par les méthodes suivantes.

#### 4° Isolement par des cultures sur milieux solides. —

On peut employer indifféremment la gélatine ou la gélose; cette dernière peut être portée à l'étuve à  $+ 38^{\circ}$ ; la gélatine, plus maniable, bien que devant être maintenue à une température inférieure à  $+ 22^{\circ}$ , est plus fréquemment employée.

Comme principe général on commencera toujours par faire des dilutions comme pour les cultures aérobies; en général, on ensemence un tube de gélatine avec une goutte du mélange; on prend une goutte de cette première gélatine pour ensemencer un second tube, et une goutte de ce second pour un troisième. La première goutte peut être diluée dans de l'eau stérilisée, si on suppose très riche la flore microbienne du produit.

a. *Méthode de Koch.* — La méthode primitive de Koch consistait à étaler la gélatine ensemencée sur une plaque (voy. p. 171) et à appliquer sur cette gélatine encore chaude et visqueuse une feuille de mica stérilisée; les bords de cette feuille étaient lutés avec de la paraffine. On pouvait observer le développement à travers le mica. CORNIL et BABES conseillaient une lame de verre très mince. Ces méthodes n'appartiennent plus qu'à l'histoire.

b. *Méthode de Liborius.* — LIBORIUS a isolé des anaérobies en

les cultivant simplement dans un tube de gélatine ou de gélose rempli aux trois quarts de la hauteur (p. 186). On mélange bien la goutte ensemencée à la gélatine ou la gélose en remuant celle-ci encore chaude avec une aiguille de platine, et on laisse refroidir. Les microbes anaérobies poussent dans la profondeur (fig. 145). Pour les recueillir, il faut couper le tube de verre à leur niveau avec un couteau à verre et un charbon de Berzélius, et recevoir le morceau de gélose dans une boîte de Pétri stérilisée. On coupe celui-ci en tranches minces jusqu'à la colonie à étudier. On peut quelquefois ne pas sacrifier le tube et aller puiser la colonie avec une pipette. Cette méthode est peu pratique lorsque les microbes liquéfient la gélatine ou développent beaucoup le gaz.

c. *Méthode de Klebs et Vignal.* — KLEBS et VIGNAL ont conseillé, en 1887, la culture sur gélatine en tubes capillaires pleins. On fait des pipettes longues de 1 mètre, avec un tube de verre de 2 ou 3 millimètres de diamètre, et on les stérilise. On fait bouillir la gélatine dans un tube à essai ordinaire, et on la laisse refroidir dans un courant d'hydrogène, amené par une



Fig. 145.

*Tube de Liborius* contenant des colonies anaérobies dans la profondeur de la gélatine.



Fig. 146.

Fragments du long tube de Vignal plein de gélatine avec colonies anaérobies.

pipette plongeant au fond du tube. Vers  $+ 25^{\circ}$  on l'ensemence dans l'hydrogène, on l'agite pour répartir les germes, et on aspire la gélatine encore liquide dans la longue et fine pipette. On ferme à la lampe les deux extrémités, et on possède un



tube capillaire clos, complètement rempli de gélatine privée d'oxygène et parsemée de germes anaérobies qui donneront autant de colonies (fig. 146). On fera trois tubes pour diluer comme avec la méthode de LIBORIUS. Pour aller saisir une colonie, on lave le tube de verre au sublimé et à l'alcool absolu, on le sèche avec du papier stérilisé, et on le coupe au niveau de la colonie.

d. Méthodes de Blücher et de Botkine. — L'isolement peut se

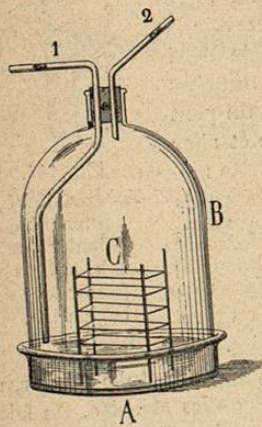


Fig. 147.

Appareil de Botkine pour la culture des anaérobies sur plaques de gélatine.

A, cuvette remplie de glycérine. — B, cloche plongeant dans la glycérine. — C, échafaudage pour supporter les plaques. — 1 et 2, tubes d'arrivée et de sortie de l'hydrogène.

heure et on ferme à la lampe (1) et (2).

e. Méthode de C. Frœnkel. — C. FRÖNKEL isole les anaérobies sur gélatine roulée en tubes d'Esmarch (voy. p. 178) avec l'appareil dessiné (fig. 148).

C'est un simple tube à essai fermé avec un bouchon de caoutchouc qui laisse passer deux tubes de verre dont l'un (A)

faire par cultures sur plaques de gélatine d'après la méthode de Koch pour les aérobies (voy. p. 171).

Pour priver les plaques d'oxygène, BLÜCHER a recommandé un appareil consistant en une petite cloche de verre, en forme d'entonnoir, placée dans un cristallin rempli de glycérine diluée; la cloche est chargée par un poids de plomb et l'hydrogène pénètre par en haut.

A peu près semblable est l'appareil de BOTKINE représenté (fig. 147). L'hydrogène arrive par (1) et sort par (2). Un petit triangle en fer porté par trois pieds émerge de la glycérine et supporte soit un échafaudage de boîtes de Pétri, soit des plaques de Koch portées par un support en baguettes de verre. L'hydrogène passe pendant une demi-

plonge jusqu'au fond du tube. Le bouchon est recouvert de paraffine. On ensemence la gélatine liquide (on fait toujours plusieurs tubes pour diluer comme il a été dit plus haut), on fait barboter l'hydrogène pendant quatre minutes, on ferme

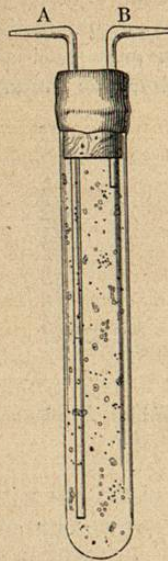


Fig. 148.

Tube de C. Frœnkel pour la culture des anaérobies sur gélatine enroulée par la méthode d'Esmarch.



Fig. 149.

Tube de Roux pour cultures sur plaques de gélatine enroulée par la méthode d'Esmarch.

les deux tubes à la lampe et on enroule la gélatine, comme il a été dit page 178.

Ce procédé est très simple; il a tous les avantages de celui d'Esmarch; on peut aller puiser les colonies sans sacrifier le tube et sans le contaminer.

f. Méthode de Roux. — Le procédé de Roux isole aussi les anaérobies sur gélatine enroulée dans un tube. On prend trois tubes de verre ayant la forme figurée page 177, on les charge



d'une petite quantité de gélatine stérilisée; on les ensemence successivement (système des dilutions) avec le liquide à étudier. On étrangle le tube en (b) on pousse le tampon et on allonge en (a) au-dessus du coton (fig. 149). On met le tube en communication avec une machine pneumatique pendant que la gélatine est encore liquide et on ferme en (a). On roule le tube d'après la méthode d'Esmarch. On peut aussi coucher simplement le tube sur le côté et avoir une culture sur

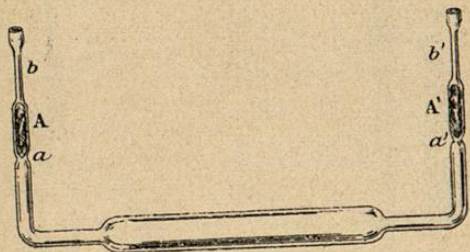


Fig. 150.

Tube de Roux pour la culture des anaérobies sur plaques de gélatine, dans un gaz inerte.

plaque. On puisera avec une aiguille de platine les microbes des colonies par l'ouverture (a) du tube dont on aura cassé la pointe; on pourra, si cela est nécessaire, couper longitudinalement le tube et détacher la gouttière supérieure lorsque la gélatine aura été simplement refroidie en plaque et non roulée en Esmarch; la gouttière inférieure sera alors traitée comme une plaque ordinaire.

Pour éviter l'emploi d'une machine pneumatique, Roux a conseillé le tube représenté figure 150. On remplit de gélatine liquide et ensemencée avec un petit entonnoir capillaire. On étrangle alors en (a) et (a'), on pousse les tampons de ouate (A) et (A'), on effile en (b) et (b') et on met (b) en rapport avec une source d'hydrogène. On ferme dans le gaz en (b') puis en (b). Le tube peut alors être simplement couché horizontalement pour avoir une petite plaque ou roulé par le procédé d'Esmarch.

## CHAPITRE VII

## EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES

Quels sont les caractères, utiles à la différenciation de l'espèce, fournis par l'examen macroscopique des cultures? Nous allons passer en revue les points principaux sur lesquels doit se porter l'attention du bactériologiste.

**1° Aérobiose.** — On s'assurera d'abord, par les méthodes décrites dans les deux chapitres précédents, si le microbe est *aérobie, anaérobie* ou *facultatif*.

**2° Rapidité de la végétation.** — Tous les microbes ne donnent pas, sur le même milieu, une culture appréciable à l'œil au bout du même nombre d'heures; les uns poussent très rapidement, d'autres avec une lenteur désespérante. Il faudra noter avec soin ces différences. Chaque microbe sera, bien entendu, cultivé sur son milieu favori, et à une température eugénésique. Citons quelques exemples. Koch a recommandé la culture du *Vibron cholérique* en solution de peptone (voy. p. 691) pour faire le diagnostic bactériologique du choléra; en six à dix heures, le vibron a donné un voile très appréciable avant que les autres microbes des selles se soient développés. On fait, depuis Roux et YERSIN, le diagnostic bactériologique de la diphtérie en ensemençant par stries la fausse membrane sur des tubes de sérum gélinifié (voy. p. 633). Au bout de seize heures, seul le *Bacille de Löffler* doit avoir donné des colonies visibles. D'autres microbes, au contraire, ne commencent à végéter qu'après une longue période d'incubation; le *Bacille de la*