

ront naturellement beaucoup suivant la méthode employée.

Le *nécessaire de Miquel* (fig. 211) est une boîte (A) de 38 centimètres de hauteur, sur 35 centimètres de largeur et 22 centimètres de profondeur. Un tiroir inférieur (B) comprend quinze compartiments destinés à recevoir autant de ballons coniques, à base large de 5 centimètres de diamètre, pour culture sur gélatine étalée. Au-dessus du tiroir, est une plaque métallique en laiton (C) qui se tire et sur lesquels seront placés les ballons de gélatine à liquéfier au moyen d'une lampe à alcool (D) installée au-dessous. L'étage supérieur est divisé en compartiments renfermant: deux vases à dilution de 500 centimètres cubes, deux de 50 centimètres cubes, deux de 10 centimètres cubes contenant de l'eau stérilisée; une lampe à alcool. Un râtelier situé contre la paroi postérieure maintient des tubes à essai renfermant les pipettes graduées et stérilisées. Quelques flacons, quelques plaques, une pipette à boule, pour emporter un échantillon d'eau, en complètent l'outillage.

Le *nécessaire de G. Roux* (fig. 212) est « une boîte en zinc, à peu près cubique, de 35 centimètres environ dans les trois dimensions, à double parois, circonscrivant un espace vide de 10 centimètres de largeur, tout à fait analogue à celui des étuves à incubation et destiné à recevoir des fragments de glace concassée (B); un robinet (I) placé à la partie inférieure d'une des faces de la boîte permet de vider l'eau de fusion; l'extérieur est recouvert de feutre. Dans ce grand espace vide central s'engage un panier en fil de laiton (G) pouvant être complètement enlevé, comme celui de l'autoclave, et divisé, par des cloisons transversales, également en laiton, en six étages superposés. Les quatre étages inférieurs (E) sont agencés, grâce à une série d'encoches en forme de croissants qui limitent les deux bords libres, de façon à recevoir, couchés sur un plan horizontal, des tubes à essai contenant 2 ou 3 centimètres cubes seulement de gélatine stérilisée, lesquels sont maintenus bien en place et sans ballotement possible par des bandes de caoutchouc adaptées aux deux extrémités de chacun des bords de la cloison horizontale. »

« Quant aux deux étages supérieurs, ils sont constitués par

des cylindres métalliques placés de champ, dans lesquels seront introduits et solidement fixés les tubes pipettes à extrémité effilée. Une place est réservée au thermomètre (H). Des annexes latérales (A, A') renferment des tubes à essai, contenant

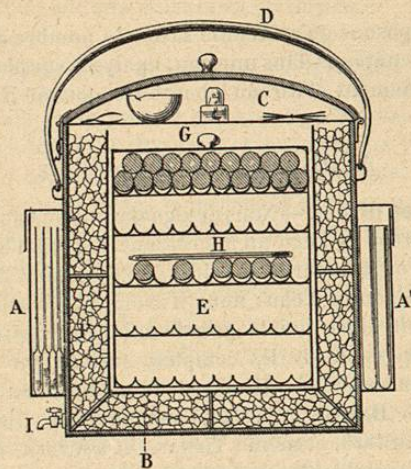


Fig. 212.

Nécessaire de G. Roux pour l'ensemencement sur place des eaux à analyser.

AA', annexes; B, glace; C, compartiment du couvercle; D, anse; E, étages; G, panier en fil de laiton; I, robinet.

des quantités strictement déterminées d'eau stérilisée et des pipettes jaugées et stérilisées. »

« Le couvercle est fortement bombé et creux; dans sa cavité (C) se trouvent: une lampe à alcool munie d'un chalumeau et d'un petit insufflateur en caoutchouc, une petite capsule en métal, un trépied pliant, des pinces, des ciseaux, des étiquettes et quelques feuilles de papier à filtrer. Les annexes ont des couvercles spéciaux. Une anse (D) permet de porter la caisse sans difficulté. »

Nous parlerons plus loin du *nécessaire* employé dans le laboratoire d'ARLOING.

§ 2. — ANALYSE QUANTITATIVE

Nous supposons qu'on veuille savoir le nombre des éléments microbiens contenus dans une eau, analysée sur place ou transportée rapidement et à 0° au laboratoire, comme il vient d'être dit.

A) EXAMEN MICROSCOPIQUE

1° Examen direct. — Nous ne signalerons que pour mémoire l'examen direct de l'eau au microscope. Depuis l'invention du microscope on a regardé à l'aide de ce dernier la flore et la faune d'une goutte d'eau; nous n'avons pas besoin d'ajouter qu'on ne voit ainsi que la grande minorité des microbes et qu'il est impossible de les compter, surtout par rapport au volume d'eau employée. Il en est de même si on examine le dépôt formé. HARRAL en 1850, COHN en 1866, HIRT en 1879, MACDONALD en 1883, et même TIEMANN et GÄRTNER, en 1889, ont préconisé de semblables procédés.

2° Examen après évaporation. — KOCH avait légèrement perfectionné la méthode en examinant les microbes après évaporation de l'eau et *coloration* du résidu. La goutte d'eau était évaporée sur la lamelle chauffée à la flamme d'une lampe à alcool. KOCH colorait au bleu de méthylène.

3° Examen après fixation. — CERTES, en 1880, et 1882, a fixé les microbes d'une goutte d'eau au moyen de l'*acide osmique*. Dix ou douze gouttes d'une solution d'acide osmique à 1 p. 100 sont introduites dans une petite éprouvette stérilisée; on verse ensuite lentement 30 à 40 centimètres cubes de l'eau à analyser en agitant de temps en temps. Au bout de quelques minutes, on ajoute de l'eau distillée pour atténuer l'action de l'acide osmique, et on laisse déposer. On décante au bout de vingt-

quatre heures, et on examine le dépôt après coloration avec une couleur d'aniline. Nous dirons, avec G. ROUX, que cette méthode est excellente pour l'examen des infusoires, et enfantine pour l'analyse bactériologique de l'eau.

En somme, l'examen microscopique ne peut rendre aucun service pour le but que nous nous proposons.

B) ANALYSES PAR CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES

La méthode d'analyse par cultures liquides date des mémorables expériences de PASTEUR et JOUBERT, en 1878. MIQUEL, CHAUVEAU et ARLOING ont perfectionné les détails.

Les différents procédés se partagent en deux groupes. Dans un *premier groupe*, l'eau est puisée directement dans la pipette qui servira à la répartir dans les ballons de bouillon; il faut alors que la pipette soit très effilée pour donner des gouttes très fines, $\frac{1}{100}$ à $\frac{1}{150}$ de centimètre cube, c'est le procédé de CHAUVEAU et ARLOING, employé à Lyon depuis bientôt vingt ans. Il est le procédé de choix, à condition toutefois que l'eau ne soit pas trop impure, car on ne peut obtenir des gouttes inférieures à un certain volume. Le *second groupe* comprend tous les procédés où on fait une *dilution* préalable de l'eau à analyser dans de l'eau stérilisée pour qu'une goutte moyenne ne contienne que très peu d'eau microbienne. Ce sont les procédés de MIQUEL, de FOL et DUNANT. En principe, il faut arriver à ce que chaque ballon ne soitensemencé qu'avec *un seul microbe*; si donc l'eau est peu riche, il suffit de la fractionner en gouttes très fines; si l'eau est très impure, il faut la diluer. Lorsqu'on peut éviter la dilution, le procédé de CHAUVEAU et ARLOING est incontestablement le meilleur.

Pour choisir un des procédés précédents et pour savoir (au cas où on s'adresserait au second groupe) quelle dilution il faut employer, il est indispensable de procéder à une *analyse préalable sommaire*, indiquant la richesse microbienne approximative de l'eau. Cette analyse préalable sera aussi utile pour les méthodes sur milieux solides.

MIQUEL pratique cette *analyse préalable* de la façon suivante.

On ensemence des ballons de bouillon, les uns avec une goutte de l'eau suspecte, d'autres avec une goutte de l'eau diluée au 100^e, d'autres avec une goutte de l'eau au 1000^e, d'autres enfin avec une goutte de l'eau diluée au 1 000 000^e ou même plus. On met les ballons à l'étuve et on les examine au bout de vingt-quatre heures. On choisira la dilution correspondant à celle dont les ballons sont restés clairs en majorité. Si, par exemple, tous les ballons ensemencés avec une goutte de la dilution à 1/100^e sont troubles, et que 8 sur 10 des ballons ensemencés avec une goutte de la dilution à 1/1000^e soient restés clairs, on choisira la dilution à 1/1000^e. Si un dixième seulement des ballons ensemencés avec l'eau pure est trouble, on se passe de dilution et on choisira le procédé de CHAUVEAU et ARLOING. Il va sans dire que le procédé de CHAUVEAU et ARLOING s'applique surtout aux analyses où on peut aller faire soi-même le puisage, en raison de la délicatesse des pipettes; on peut néanmoins l'employer en puisant dans l'échantillon envoyé au laboratoire.

G. Roux fait des dilutions variant de 1/10^e à 1/4000^e, et ensemence 1 centimètre cube des dilutions dans deux ou trois tubes de gélatine liquéfiée et étalée sur une portion de la paroi du tube maintenu horizontal. Au bout de trois ou quatre jours, on compte les colonies. Le gros inconvénient est de nécessiter une attente de quatre jours lorsque le même échantillon (maintenu naturellement à la glacière) doit servir à l'analyse définitive.

Il faudra toujours, autant que possible, faire un nouveau puisage pour l'analyse ultérieure.

1^o Procédé de Chauveau et Arloing. — Son grand avantage est d'éviter toute cause de contamination; l'eau est directement puisée dans une pipette stérilisée, et n'en sort que pour tomber dans les ballons de bouillon, fractionnée en gouttes très fines. La pipette, fabriquée ainsi que nous allons l'expliquer, est stérilisée et privée de la plus grande partie de son air au moyen du chauffage ou de l'aspiration par une trompe et scellée à la lampe. Elle est transportée au lieu de la prise; l'extrémité

effilée est plongée dans l'eau et brisée à ce moment avec une pince ou des ciseaux stérilisés. L'eau se précipite jusqu'à une certaine hauteur sans jamais atteindre le coton; si le vide n'avait pas été fait on pourrait aspirer avec un tube en caoutchouc. Lorsque la pipette est suffisamment chargée, on la retire et on scelle à la lampe son extrémité effilée. Il faut avoir soin,

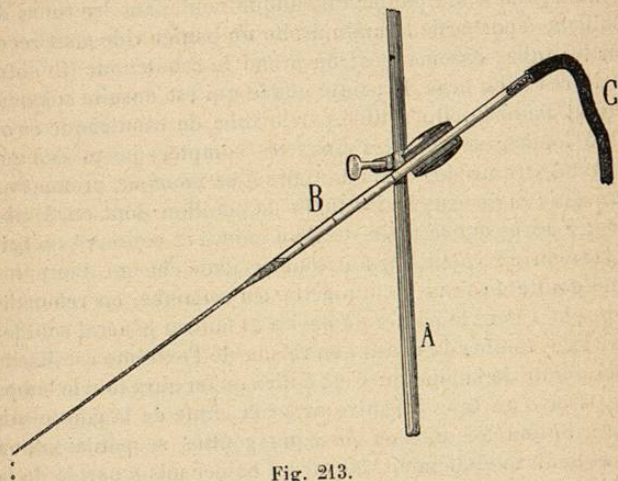


Fig. 213.

Pipette de Chauveau et Arloing en place pour l'ensemencement en ballons de bouillon de l'eau à analyser.

avant de retirer la pipette de l'eau, lorsqu'elle est assez remplie, de briser la grosse extrémité de la pipette pour permettre la rentrée de l'air à travers le coton et empêcher ainsi qu'il ne pénètre par l'effilure avant que celle-ci soit scellée hors de l'eau.

Il s'agit, alors, de répartir cette eau dans des ballons ou tubes de bouillon; on le fera de préférence sur place, aussitôt après le puisage, sinon on transportera la pipette dans un manchon de glace. Pour faire l'ensemencement sur place, des tubes de bouillon sont plus faciles à transporter que des ballons. La répartition exige un support métallique (A) destiné à mainte-

nir la pipette (B) légèrement inclinée dans une position qui restera la même pendant toute l'expérience (fig. 213). Une pince, une lampe à alcool, un tube de caoutchouc du diamètre de la pipette compléteront l'outillage. La pipette a été jaugée, comme il sera dit plus loin, et des traits à la lime indiquent les $\frac{1}{4}$ de centimètre cube. On se tient prêt, ayant à portée de la main gauche un panier métallique contenant les tubes de bouillon, à portée de la main droite un panier vide pour recevoir les tubesensemencés; on prend le caoutchouc (C) entre les lèvres et on brise la pointe effilée qui est ensuite soigneusement flambée. On souffle par le tube de caoutchouc et on laisse tomber des gouttes (sans les compter) jusqu'à ce que l'eau affleure un des traits de lime. A ce moment, prenant un à un de la main gauche les tubes de bouillon dont on flambe l'orifice après que la main droite a enlevé et conservé en l'air le tampon de coton, on fait tomber dans chacun d'eux une seule goutte de l'eau de la pipette. On re flambe, on rebouche et on place dans le panier de droite. Il faut en général souffler pour faire tomber la goutte, en raison de l'extrême capillarité de la pointe de la pipette; c'est-à-dire qu'on aura tout le temps de passer d'un tube à l'autre avant la chute de la goutte suivante. Si toutefois une ou plusieurs gouttes se perdaient, on les noterait mentalement, ou sur un papier mis à portée de la main droite. Lorsqu'on a ainsiensemencé 150 à 200 tubes de bouillon, on continue à faire tomber des gouttes, *en les comptant*, jusqu'à un trait de lime. Additionnant alors le nombre de tubes employés et celui des gouttes perdues ou tombées à la fin, on a le chiffre des gouttes correspondant au nombre de divisions des graduations de la pipette. Supposons un cas moyen. On aensemencé 150 tubes, et il a fallu faire tomber encore 25 gouttes pour arriver à une ligne de la pipette; on a utilisé 3 divisions de la pipette, soit $1^{\text{cc}}\frac{1}{4}$ (chaque division valant $\frac{1}{4}$ de centimètre cube). 175 gouttes pour 1^{cc} , 25 donnent exactement 140 gouttes au centimètre cube. Chaque tube a donc étéensemencé avec $\frac{1}{140}$ de centimètre cube. Une étiquette note ce chiffre, la nature de l'eau, la date de l'ensemencement. On rentre au laboratoire, on place les tubes à

+ 38°, et on attend huit jours avant de faire la numération des tubes fertiles. Les raisons pour lesquelles il faut attendre huit jours seront développées à propos du procédé de MIQUEL. Supposons que 50 tubes sur 150 soient troubles, on a le nombre de microbes par centimètre cube (x) au moyen d'une simple proportion :

$$\begin{aligned} \frac{x}{140} &= \frac{50}{150} \\ x &= \frac{140 \times 50}{150} \\ x &= 46,666 \end{aligned}$$

L'eau en question contient 46 à 47 microbes par centimètre cube, soit 46 666 microbes par litre.

Nous répétons que ce procédé est parfait lorsque l'eau n'est pas trop riche en microbes. On verra plus loin (procédé de MIQUEL) quelle proportion de tubes doit rester claire pour que l'analyse soit exacte, c'est-à-dire pour que chaque tube n'ait réellement reçu qu'un seul microbe. La pipette doit donner des gouttes équivalant à $\frac{1}{120}$ de centimètre cube au maximum; on peut arriver à obtenir des fractions encore plus petites que $\frac{1}{150}$ de centimètre cube.

La fabrication de la pipette est le point le plus délicat du procédé. On choisit un tube de verre d'un demi-centimètre de diamètre, de calibre aussi égal que possible dans toute son étendue. On le gradue avec du mercure en quarts ou moitiés de centimètre cube, et chaque division est marquée d'un trait de lime, qu'on noircit à l'encre. On étire alors ce tube en pipettes comme il l'a dit page 20, en ayant soin que l'effilure soit bien dans l'axe central du corps de la pipette, et non plus ou moins latéralement. On fait un léger rétrécissement à 6 ou 7 divisions de l'origine de la partie effilée, on introduit un tampon de ouate peu serré; on fait un second rétrécissement plus marqué que le premier, et on fait stériliser au four Pasteur. Au moment de partir pour faire une analyse on modifie la partie effilée, qui devient, à dater de ce moment, extrêmement fragile. Délaissant le chalumeau, on se sert d'une lampe à alcool. On chauffe au rouge la partie conique, origine de l'effilure, et

on l'étire lentement après l'avoir sortie de la flamme. Cette seconde effilure a une capillarité bien supérieure à la première, elle est très flexible, et paraît même souvent ne pas avoir de canal central. On saura à l'usage la valeur de la goutte. Avec un peu d'habitude on juge à la grosseur de la pointe les pipettes qui ne donneraient pas des gouttes inférieures à $1/100^{\circ}$ de centimètre cube. La seconde effilure doit, comme la première, être autant que possible dans l'axe du canal de la pipette et non latérale. Les gouttes qui tomberont d'une telle pipette *auront un poids sensiblement égal*. On scelle la pointe à 8 ou 10 centimètres de son origine, on chauffe la pipette ou on la met en rapport avec une machine pneumatique, et on scelle le rétrécissement qui laisse le tampon dans la pipette. Celle-ci est prête à être utilisée.

L'inconvénient du procédé de CHAUVEAU et ARLOING réside dans la fragilité de la pipette et dans la difficulté de son transport dans la glace après son remplissage. Aussi vaut-il mieux faire toujours lesensemencements sur place. ARLOING a fait construire pour cela un *nécessaire* composé de trois boîtes en bois munies de manettes. L'une est une simple caisse munie d'un couvercle à charnière et surmonté d'une poignée. La hauteur égale 25 centimètres, les dimensions latérales 30 centimètres. Elle est divisée en quatre compartiments par deux cloisons en croix, trois de ces compartiments contiennent trois paniers métalliques renfermant chacun cinquante tubes chargés de 3 ou 4 centimètres cubes de bouillon; le quatrième contient la pince, la lampe à alcool, le caoutchouc, les étiquettes, etc. Des blocs de ouate empêchent tout ballonnement. La seconde boîte (hauteur 17 centimètres; dimensions latérales, 35 centimètres) est également divisée en quatre compartiments pour loger quatre ballons à fond plat (voy. fig. 23) chargés de gélatine. La troisième boîte est uniquement destinée au transport des pipettes dont on emportera toujours une provision pour parer à tout accident. C'est une espèce d'étui plat, long de 55 centimètres, large de 15 centimètres, haut de 6 centimètres, formé de deux valves en bois dans lequel pénètre à frottements une planchette percée de petits trous sur laquelle

les pipettes sont fixées parallèlement au moyen de caoutchoucs. Deux taquets de la valve qui se referme sur la première rendent la planchette absolument immobile; on peut encore garnir avec du coton. Une manette permet de porter cette boîte.

2^o Procédé de Miquel. — Dès 1879, MIQUEL a préconisé la « *méthode du fractionnement dans le bouillon* » basée sur la dilution de l'eau à analyser dans un volume connu d'eau stérilisée, pour arriver à n'ensemencer qu'un seul microbe en faisant tomber une grosse goutte du mélange dans chaque ballon de bouillon.

C'est surtout pour cette méthode que les modes de puisage, de transport, etc., décrits plus haut sont utiles.

MIQUEL voudrait que les analyses d'eau soient faites par tous les bactériologistes dans un bouillon invariable et il propose le suivant :

Peptone Chapoteaut	20 grammes.
Sel marin	5 —
Cendres de bois	0 gr. 10.
Eau ordinaire	1000 grammes.

La dilution de l'eau se fait dans des matras Pasteur à fond plat d'une capacité variant de 30 centimètres cubes à 2 litres, qui sont à moitié remplis d'un volume connu d'eau distillée. On ajoute le volume nécessaire de l'eau à analyser et on agite vivement. On prélève le mélange avec des pipettes jaugées et stérilisées (fig. 214) donnant à peu près 25 gouttes au gramme.

La distribution se fait dans 36 ballons de bouillon, à la dose de 1 goutte dans 18 ballons et 2 gouttes dans les 18 autres. On ensemence de même 36 ballons avec les mêmes doses d'une dilution deux fois plus forte. Les 72 ballons sont mis à l'étuve à $+ 35^{\circ}$ pendant quinze jours. On compte alors les ballons troubles et on fait la numération. Pour que l'analyse soit bonne, c'est-à-dire pour que, selon toutes les probabilités, la goutte ensemencée n'ait contenu qu'un seul microbe, *il ne faut pas,*

d'après MIQUEL, plus de 30 ballons troubles pour 100, soit 21 sur 72; s'il y en a davantage, la dilution n'était pas assez forte.

Une analyse d'eau peut, d'après MIQUEL, être mise en train en 20 minutes par ce procédé.

Supposons que 108 gouttes d'eau aient étéensemencées dans 72 ballons (36 ayant reçu 1 goutte, et 36 2 gouttes; la goutte valant $\frac{1}{52}$ de centimètre cube). La dilution était à 1/1000. Supposons que 16 ballons se soient troubles en quinze jours: 108 gouttes d'eau à $\frac{1}{1000}$ renfermaient 16 microbes; 108 gouttes représentent 4^{cc},3 environ; 4^{cc},3 de la dilution renferment donc 16 microbes; l'eau à analyser en contenait 1 000 fois plus, soit 16 000. Un centimètre cube en contenait 4,3 moins, c'est-à-dire 3 651,162 environ. L'eau à analyser possédait 3 651,162 microbes par litre.

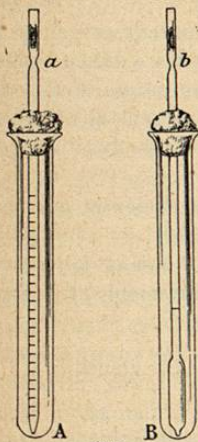


Fig. 214.

Pipettes jaugées et stérilisées dans des tubes à essai.

Appelons G le nombre de gouttes ensemencées, N le nombre des ballons troubles, T le litre de la solution, en supposant 25 gouttes au centimètre cube. Appelons Q le quotient $\frac{G}{25}$; on a la formule générale:

$\frac{N}{Q} \times T = x$ microbes par centimètre cube. $x \times 1\ 000 =$ le nombre des microbes par litre.

3° Procédé de H. Fol. — Il est plus compliqué que celui de MIQUEL, sans avoir sur lui d'avantages marqués.

La dilution, au lieu d'être faite dans de l'eau stérilisée, s'opère d'emblée dans le bouillon nutritif qui est à son tour reparti en ballons.

Nous renvoyons ceux qui désireraient connaître les appareils de H. FOL à son travail des *Archives des sciences physiques et*

naturelles de Genève (1884). Nous déconseillons cet outillage compliqué.

C) ANALYSE PAR CULTURES SUR MILIEUX SOLIDES

Le grand avantage de la méthode des cultures sur milieux solides est de bien isoler chaque élément microbien qui donne une colonie séparée; la numération est ainsi plus exacte. Cette exactitude n'est cependant qu'apparente, car nombre de microbes qui auraient pullulé en bouillon ne végètent pas sur gélatine: aussi l'analyse d'une eau sur milieux solides donne-t-elle des chiffres toujours inférieurs à ceux de l'analyse de cette même eau en milieux liquides, malgré la possibilité d'introduire deux microbes dans le même ballon de bouillon. La méthode des milieux solides permet une analyse qualitative sommaire par l'examen de la forme des colonies. Nous savons déjà que KOCH en fut l'inventeur.

1° Cultures sur plaques de gélatine ensemencée liquide.

— C'est le procédé primitif de KOCH plus ou moins modifié. Il n'a rien de spécial. Nous renvoyons pour le manuel opératoire au chapitre V où nous avons déjà décrit la façon de faire une culture sur plaque de gélatine (page 171). Il suffira de mettre dans chaque tube de gélatine une quantité connue de l'eau à analyser plus ou moins diluée suivant les cas. Le nombre de colonies développées donnera le nombre des microbes contenus dans la quantité d'eau ensemencée.

La plaque de KOCH peut naturellement être remplacée par le tube d'ESMARCH, la boîte de PETRI¹ et tous les autres appareils perfectionnés décrits au chapitre V. Lorsque nous employons la gélatine, nous nous servons de ballons en entonnoir renversé, à large fond plat, à petit orifice (fig. 23) dans lesquels la gélatine est stérilisée. On verse une quantité d'eau connue dans la

¹ RIETSCH (1890) fait ses analyses sur gélatine en répartissant celles-ci dans des godets de verre très analogues aux boîtes de PETRI et qui sont antérieurs à la découverte de PETRI, puisque NICATI et RIETSCH les ont décrits en 1885.

gélatine liquide, on agite et on laisse prendre le milieu qui s'étale en couche mince sur le fond. On peut noter, par des points à l'encre, sur la face inférieure du fond les colonies qui apparaissent. On peut aussi décalquer le fond sur des ronds de papier où on dessine jour par jour les colonies à mesure qu'elles apparaissent. On fera aisément la numération en plaçant sous la plaque une feuille quadrillée, ou en traçant à l'encre des lignes perpendiculaires qui formeront un quadrillé utile même très irrégulier. On comptera carré par carré. Ces quadrillés feront aussi des points de repère précieux.

Un inconvénient sérieux des cultures sur gélatine des microbes des eaux réside dans le grand nombre de colonies liquéfiantes qui en quelques jours envahissent toute la plaque et mélangent toutes les colonies. Pour y remédier on peut employer de la gélatine-gélose (page 111) ou la formule de GIRARD ; ces milieux liquéfient moins facilement. Voici la formule de GIRARD :

Eau	1000 grammes.
Gélatine blanche	40 —
Phosphate de soude	0 gr. 02.

On clarifie avec un blanc d'œuf, on fait bouillir, on filtre et on stérilise à + 115°.

G. Roux arrête le développement des colonies liquéfiantes à mesure qu'elles se forment en les vernissant avec du *stérésol* (de BERLIOZ) qui arrête le développement de la colonie sans diffuser sur toute la plaque de gélatine.

La boîte de Petri ou le tube d'Esmarch sont plus commodes que le ballon conique pour aller puiser les colonies et les réensemencer.

En mettant une très petite goutte d'eau dans chaque récipient de gélatine on peut éviter les dilutions. Il suffit, en tout cas, d'opérer avec trois tubes de gélatine comme il a été dit page 174.

2° Cultures sur plaques de gélatine ou de gélose, ensemençées symétriquement après solidification. — C'est le

procédé d'Arloing. Il a surtout pour but d'éviter la contamination de la plaque par des germes étrangers à ceux de l'eau à analyser. On laisse tomber en des points symétriques une série de gouttes d'eau sur la surface d'une plaque de gélatine ou de gélose solidifiée ; toute colonie développée en dehors des points ensemençés ne sera pas comptée dans la numération.

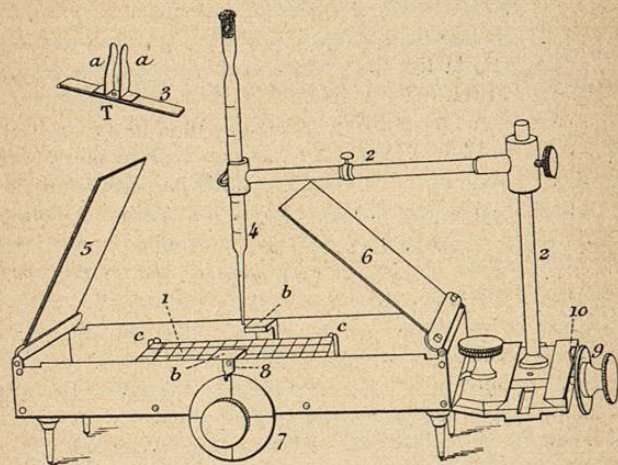


Fig. 215.

Analyseur bactériologique d'Arloing.

Ce procédé repose tout entier sur l'emploi d'un *analyseur bactériologique* spécial¹. Cet appareil (fig. 215) consiste en une boîte rectangulaire en cuivre nickelé longue de 25 centimètres sur 8^{cm},5 de largeur et 3^{cm},5 de profondeur. Le couvercle est formé de deux lames de verre (5 et 6) mobiles autour de charnières fixées aux deux bords externes les plus étroits. Un intervalle de quelques millimètres sépare les deux lames et est occupé par un couvre-joints en métal (3) glissant sans frottement et présentant à son milieu un orifice étroit (T) entre

¹ ARLOING, *Appareil pour l'analyse bactériologique des eaux*, Revue d'hygiène, 1888, p. 475.

deux languettes métalliques souples (*a, a*). Une plaque de cuivre, de la dimension des plaques de verre quadrillées, est au fond de la boîte, munie d'une crémaillère qui est actionnée par le bouton (7). Quatre montants prismatiques (*c, c*) servent à maintenir la plaque de verre. L'index (8) sert à mesurer l'avancement de la plaque; deux crans du bouton (7) font avancer la crémaillère de 1 centimètre. A une des extrémités de la boîte est une forte plaque de cuivre munie d'une coulisse; elle porte la tige (2), destinée à tenir la pipette, et une crémaillère actionnée par le bouton (9). Cette seconde crémaillère se meut perpendiculairement à la première et sert à déplacer latéralement la pipette. La plaque de verre a 12 centimètres de long sur 5 centimètres de large; elle est divisée en soixante carrés par un quadrillage. On stérilise la boîte et on introduit la plaque, chargée de gélatine solide par une petite porte opposée au bouton (9). La pipette (4) qui contient l'eau à analyser est fixée à la tige (2) et son extrémité effilée pénètre à frottement entre les tiges (*a*) dans le trou (T). Dès qu'une goutte est tombée au milieu d'un carré on tourne de deux crans le bouton (7) et on fait ainsi tomber une goutte au centre de chaque carré. La première ligneensemencée, on déplace latéralement la pipette, qui entraîne le couvre-joint (3), au moyen du bouton (9). On a ainsi une plaque quadrillée de gélatine ayant reçu une goutte d'eau au centre de chaque carré.

G. Roux a simplifié le procédé d'ARLOING en se servant d'un petit appareil dans lequel la pipette est immobile, tandis que la plaque de gélatine se déplace circulairement.

3° Procédés approximatifs de Miquel. — MIQUEL décrit sous ce nom deux séries d'opérations approximatives qui peuvent rendre des services.

Le principe est le suivant : faire végéter les colonies sur un papier nutritif imprégné de gelée de lichen qui, traité ensuite au bleu d'indigo, ne se colorera qu'au niveau des colonies. On trouvera tous les détails de la préparation de ce papier dans l'*Annuaire de Montsouris* pour 1886, p. 519 et suivantes.

Nous ne parlerons que du procédé le plus simple décrit en 1890. Le papier nutritif, taillé en rectangle et muni d'un fil suspenseur en platine, enveloppé de papier Joseph, est mis à l'autoclave pendant une heure à + 110°. Au moment de l'analyse, on le suspend par le fil de platine dans une éprouvette bouchée à l'émeri. On le tare très exactement et on le plonge dans l'eau à analyser. En cinq minutes la gelée est gonflée, imbibée d'eau. On le remet dans l'éprouvette et on fait une seconde pesée qui donnera le poids de l'eau absorbée. Le tout est alors mis à l'étuve. Au bout de quinze jours, on retire le papier, on le dessèche bien + 45°, et on le plonge pendant quelques minutes dans une solution aqueuse d'alun cristallisé, puis dans de l'eau pure. La gelée est alors plus mordante. On a préparé un second bain colorant de la façon suivante : 2 grammes d'indigotine cristallisée ont digéré pendant vingt-quatre heures dans 50 grammes d'acide sulfurique fumant; on ajoute un litre d'eau; on neutralise. On trempe le papier dans ce second bain; il se colore tout entier, les colonies en plus foncé. On lave à l'eau et on met dans une solution de permanganate de potasse à $\frac{1}{1000}$ pendant une demi-heure. La gelée de bleu est devenue violette, puis rose. On lave. On trempe dans une solution faible d'acide oxalique à 3 ou 5 p. 100. On lave. Les colonies tranchent en bleu sur le papier redevenu blanc. MIQUEL a reproduit ces feuilles dans l'*Annuaire de Montsouris* pour 1886. L'indigo est une couleur très fixe : aussi, loin de se décolorer, ces feuilles se foncent-elles à la lumière.

On compte les colonies bleues et on les rapporte à la quantité d'eau employée.

4° Numération des colonies par la photographie. —

G. Roux a proposé d'enregistrer les colonies de la plaque de gélatine en appliquant celle-ci sur un papier sensible. La gélatine est répartie à la dose de 2 centimètres cubes dans de larges tubes à essai comme pour la méthode d'Esmarch. Après l'ensemencement, on couche les tubes horizontalement sur une planchette munie à ses deux extrémités d'encoches demi-circulaires. La gélatine est donc en plaque plane et non enrou-

lée. Lorsque les colonies ont apparu, on glisse sous l'ensemble des tubes un papier sensible au ferrocyanure de potassium et on met le tout à la lumière (pas trop vive pour éviter la fusion de la gélatine). Lorsque le papier est gris bleu, on le retire brusquement, on le lave à grande eau et on laisse sécher. Les plus petites colonies se détachent en blanc sur fond bleu. On répète cette opération tous les deux ou trois jours et on conserve tous ces documents datés.

§ 3. — ANALYSE QUALITATIVE

L'analyse qualitative, avons-nous dit, est le but vers lequel doit tendre le bactériologiste chargé d'examiner une eau au point de vue microbien. Il est plus important de savoir le nombre et le nom des espèces microbiennes contenues dans une eau que de calculer le nombre des individus non déterminés qui la souillent. Malheureusement, la classification des microbes, la détermination de l'espèce, se heurtent, comme nous l'avons développé dans l'*Introduction* (p. 6), à des difficultés presque insurmontables. Si on réfléchit, en outre, que nombre de microbes (*B. tuberculeux*, *Gonocoque*, etc.) ne poussent pas sur les milieux ordinairement employés pour les analyses d'eau, que beaucoup de microbes pathogènes nous sont totalement inconnus, on se rend compte de la prudence avec laquelle doivent être rédigées les conclusions d'une analyse qualitative. Enfin l'analyse qualitative, n'ayant pas de technique fixe, mais exigeant de celui qui l'entreprend une foule de connaissances non seulement en bactériologie pure, mais en physiologie, en chimie, en pathologie, etc., aura la valeur de celui qui l'a dirigée, bien différente en cela de l'analyse quantitative qui, suivant l'expression de Miquel, peut être faite par un bon garçon de laboratoire.

L'idéal de l'analyse qualitative serait l'énumération de toutes les espèces contenues dans un échantillon d'eau; cette *analyse qualitative générale* suivrait donc forcément l'analyse quantitative qui aurait isolé les germes. On se contente en général

de l'*analyse qualitative spéciale*, c'est-à-dire de rechercher si une eau contient tel microbe pathogène donné.

A) ANALYSE QUALITATIVE GÉNÉRALE

Une fois en possession des cultures pures des microbes d'une eau, on se servira, pour différencier les espèces, de tous les moyens qui sont à notre disposition et que nous avons étudiés au chapitre v : cultures successives, sur différents milieux, à différentes températures; on fera l'examen macroscopique et microscopique, examen chimique des bouillons de culture, on inoculera aux animaux, etc. Nous n'avons pas à revenir sur ces méthodes. Toutes ces constatations épuisées, comment pourrait-on appliquer un nom à chaque espèce? Existe-t-il des tables dichotomiques qui puissent guider le microbiologiste et le conduire au nom de l'espèce par éliminations successives? Existe-t-il en un mot des ouvrages sur les flores microbiennes comparables à ceux qui traitent des flores végétales générales? Peut-on déterminer les microbes d'une eau, comme les plantes d'une montagne? Plusieurs auteurs ont tenté la description des microbes des eaux et la création de tables dichotomiques; ces publications rendront des services, à la condition expresse de se souvenir qu'elles n'ont rien d'absolu, que tous les caractères sur lesquels se basent leurs classifications sont trop variables pour que la détermination d'un microbe soit comparable à celle d'une plante plus élevée; le microbe est situé trop bas dans l'échelle des êtres pour être aussi facilement individualisé (voy. *Introduction*). Nous renvoyons plus spécialement le lecteur aux ouvrages de LUSTIG¹, EISENBERG², G. ROUX³ pour la description des microbes habituels des eaux.

B) ANALYSE QUALITATIVE SPÉCIALE

Le problème devient plus abordable lorsqu'on demande au bactériologiste si un échantillon d'eau contient telle espèce

¹ LUSTIG, *Diagnostica dei Batteri delle acque*. Torino, 1890.

² EISENBERG, *Bakteriologische Diagnostik* (Hamburg und Leipzig, 1891).

³ G. ROUX, *Loc. cit.*, ch. ix.