

BULLETIN MENSUEL

DE LA

SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON

FONDÉE EN 1822

RECONNUE D'UTILITÉ PUBLIQUE PAR DÉCRET DU 9 AOUT 1937

DES

SOCIÉTÉS BOTANIQUE DE LYON, D'ANTHROPOLOGIE ET DE BIOLOGIE DE LYON

RÉUNIES

et de leur GROUPE de ROANNE.

Secrétaire général : M. LOCQUIN, 76, bd des Belges, 6^e. *Trésorier* : H. GRIVEL, 1, rue Bellecour, 2^e.**SIÈGE SOCIAL A LYON : 33, rue Bossuet, 6^e (Immeuble Municipal)**

ABONNEMENT ANNUEL c/c p. Lyon 101-98.	France et Colonies Françaises.	100 francs
	Étranger.	200 —

Les fleurs très nombreuses et densément imbriquées sont pédicellées et munies d'une petite bractée membraneuse, un peu en forme de coupe et dentelée au bord. Les sépales et les pétales sont oblongs et légèrement dentelés dans le haut. Ces caractères du périanthe sont ceux de la fleur femelle. Les 6 étamines, qui sont opposées aux divisions du calice et de la corolle et sont réunies en anneau à la base, les dépassent très longuement. Au centre de la fleur se trouve un ovaire rudimentaire surmonté par l'ébauche de 3 stigmates.

Présenté à la Section Botanique en sa séance du 12-5-45.

SUR QUELQUES MÉTHODES DE CONCENTRATION ET DE SÉPARATION DES MICROORGANISMES

par Marcel Locquin.

Mon intention n'est pas, dans cette courte note, de passer en revue les méthodes de concentration et de séparation mises au point jusqu'à ce jour, par de nombreux auteurs, spécialement en coprologie microscopique. Elles se trouvent condensées avec toutes les références utiles dans le traité de microscopie de LANGERON par exemple.

Sur quelles propriétés sont basées ces méthodes? Tout d'abord sur des propriétés purement physiques telles que la densité et la mouillabilité et sur quelques propriétés chimiques. Ces dernières font intervenir des réactions, dissolution par exemple, souvent fort complexes et ne sont jamais séparées des méthodes physiques qui restent dans tous les cas indispensables.

Parmi les méthodes récentes ou peu connues, spécialement utilisées pour la séparation et la concentration des organismes très petits comme les spores et les bactéries, deux me paraissent pouvoir être améliorées du point de vue technique.

Il s'agit de la flottation (ou moussage) d'une part, de la décantation d'autre part.

Flottation¹.

La flottation proposée par DOGNON et DUMONTET en 1941 pour la concentration de bactéries en suspension dans un milieu liquide est une opération qui est industriellement appliquée pour la séparation de certains minerais du stérile qui les accompagne.

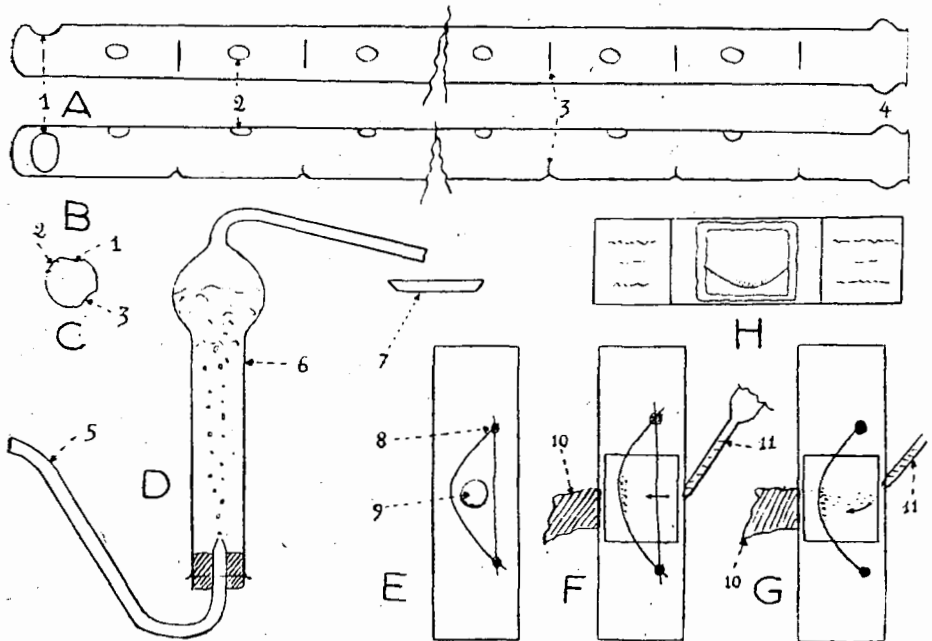
En technique microscopique cette opération peut se pratiquer avec le petit appareil très simple de DOGNON et DUMONTET que l'on trouvera décrit dans le traité de SÉGUY : *Le microscope, emplois et applications*, V. I. 1942.

Cette méthode peut être perfectionnée et servir non plus à la concentration pure et simple des microorganismes, mais aussi à leur séparation par

1. Consulter pour l'ensemble de cette technique l'exposé de A. DOGNON : Concentration et séparation par les mousses. Quelques applications chimiques et bactériologiques, in *Act. Sc. et Industr.*, I : Sur les phénomènes de mouillabilité et les applications de ces phénomènes. 1942.

différence de taille, de densité ou de mouillabilité. Pour ce faire, il faut modifier le cylindre mousser de DOGNOX et DUMONTIER suivant le schéma ci-joint (cf. fig. D) en remplaçant la partie tronconique supérieure de ce cylindre par une portion renflée surmontée d'un tube recourbé très court.

Le liquide contenant en émulsion les éléments à séparer est introduit dans la partie cylindrique du tube de manière à la remplir complètement sans entrer dans la partie sphérique. Les mousses sont formées par un courant d'air injecté dans le liquide par la tubulure inférieure effilée. Dans ces mousses passent successivement les particules amorphes puis les éléments microscopiques par ordre approximatif de grosseur ou de densité ou de



Pl. I : Tube à séparation A et B, vues longitudinales à 90° l'une de l'autre. C, coupe transversale (1; orifice d'entrée; 2, orifices pour prélèvements; 3, « crans »). — Cylindre mousser de DOGNOX-DUMONTIER modifié : D (5, tube de soufflage; 6, corps du cylindre; 7, verre récepteur). — Microentraînement : E, F, G, H (8, fils de verre fixés par deux gouttes de lut; 9, goutte de liquide; 10, buvard; 11, pipette).

mouillabilité. Il est facile de mettre à profit ces propriétés pour les séparer en même temps qu'on effectue leur concentration. Il suffit de régler le courant gazeux émulsionnant de telle façon que les mousses soient tout entières contenues dans la partie sphérique; périodiquement on augmente pendant quelques secondes la vitesse du courant d'air qui chasse ainsi une certaine quantité de mousses dans le tube supérieur; on recueille ces mousses dans un verre de montre ou directement sur lamelle, on les laisse reposer quelques instants, on recouvre d'une lamellule et on observe. On continue l'opération aussi longtemps et on effectue des prélèvements aussi nombreux qu'il est nécessaire pour obtenir une préparation contenant les éléments intéressants.

Remarquons tout de suite que cette méthode permet, dans certains cas, d'obtenir une séparation d'éléments intéressants, séparation qu'il aurait été impossible d'obtenir par sédimentation ou centrifugation fractionnée par exemple. En effet, dans la flottation intervient comme principal facteur physique de la séparation non pas seulement la densité ou la grosseur des éléments, mais aussi l'état physique de leur surface. Et cet état physique est absolument indépendant des deux autres propriétés. On peut améliorer encore certaines séparations par l'addition en quantités infimes d'éléments facilitant l'émulsion tels que des électrolytes : chlorure de sodium, sulfate d'ammonium par exemple ou des agents mouillants : Enerpon, mucine, saponine, etc...

Entraînement.

La deuxième méthode ou méthode d'entraînement peut être pratiquée des deux façons originales suivantes :

1. — *Macroentraînement.*

Par utilisation du tube à séparation (schématisé sur les figures A, B, C).

Ce tube dont les dimensions doivent être adoptées à chaque cas particulier est séparé en petits compartiments par une série de petits « crans » très peu saillants ($1/2$ à 1 mm.). En regard de chacun des compartiments ainsi délimité se trouve une perforation dans la paroi du tube permettant de faire des prélèvements avec une micropipette : une grosse ouverture à l'une des extrémités permet l'introduction du liquide à étudier.

On peut utiliser ce tube de verre de deux façons différentes :

a) Lorsqu'on ne dispose que d'une petite quantité de liquide à étudier on verse celui-ci par l'ouverture (1) le tube étant incliné et préalablement mouillé intérieurement. On ramène ensuite lentement le tube dans la position horizontale en laissant écouler le liquide le plus doucement possible dans la partie lisse du tube. Lorsque celui-ci a atteint l'autre extrémité on fait effectuer au tube une brusque rotation d'un quart de tour qui a pour but de séparer le liquide en un certain nombre de fractions en le faisant écouler dans les différents compartiments de la partie « crantée ». Cette séparation effectuée il ne reste plus qu'à prélever avec une micropipette dans les différents compartiments un peu de liquide pour l'examiner. Les éléments en suspension dans le liquide se répartissent à peu près par ordre de grosseur et de densité, les plus petits et les moins denses étant entraînés le plus loin de l'extrémité (1).

b) Lorsqu'on dispose d'une quantité de liquide plus grande on peut se servir du tube en marche continue de la façon suivante : on fait écouler lentement le liquide sur la partie crantée, le tube restant immobile cette fois-ci pendant toute la durée de l'opération. On termine par un lavage avec un liquide approprié et on prélève un échantillon dans chaque compartiment comme précédemment. Le point délicat de l'expérimentation est le réglage du débit du liquide. Plusieurs essais sont souvent nécessaires. La précision du fractionnement du tube en marche continue est beaucoup plus grande que celle que l'on peut obtenir par n'importe quelle autre méthode, elle dépend surtout du débit du liquide et de la longueur du tube.

II. — *Microentraînement.*

On peut utiliser l'entraînement par l'eau d'une tout autre manière pour effectuer une *concentration* de microorganismes. Cette autre méthode a le gros avantage d'être applicable à des quantités infimes de liquide (de l'ordre du millimètre cube) elle ne permet pas, par contre, la *séparation des éléments de taille ou de densité différentes.*

Comme pour le macroentraînement il y a deux variantes à cette méthode.

a) Lorsqu'on ne dispose que d'une goutte de liquide. On place sur une lame deux fils de verre diamètre légèrement supérieur au diamètre des microorganismes étudiés (fig. E et F).

Ces fils de verre sont immobilisés dans la position indiquée par la figure à l'aide de deux gouttelettes d'un lut quelconque sirupeux. Ces deux gouttelettes doivent être assez écartées pour être situées ultérieurement en dehors de la lamelle couvre objet.

On place la goutte à étudier à l'intérieur du segment déterminé par les deux fils et on recouvre d'une lamelle avec précautions. On aspire l'excès de liquide s'il y a lieu avec une bandelette de buvard du côté convexe du segment. On peut alors effectuer la concentration des deux manières suivantes :

— On lute les bords de la préparation au lut de RONDEAU DU NOYER et on laisse sédimenter verticalement la préparation dans une boîte à rainures en disposant le bord courbe du segment vers le bas. A la longue tous les microéléments se rassemblent dans la concavité du fil (fig. H).

— On effectue plus rapidement cette concentration en immobilisant la lamelle aux quatre angles par un peu de lut pâteux et en faisant passer un peu de liquide avec une micropipette et une bandelette de buvard ou de papier filtre. Les éléments s'accumulent alors dans la concavité de la cellule déterminée par le fil de verre (fig. I).

b) Lorsqu'on dispose de quantité de liquide relativement plus grande (plus d'une goutte) on peut modifier ainsi le procédé ; on ne laisse subsister de la cellule que le fil arqué et on effectue directement la concentration sous la lamelle couvre objet en introduisant le liquide par le bord opposé au côté concave du fil avec une micropipette et en l'aspirant au bord opposé avec une bandelette de papier filtre. On termine le montage comme précédemment (fig. G).

Notons que toutes ces opérations peuvent en tout ou en partie être faites à chaud et que par conséquent les objets ainsi concentrés peuvent être montés dans un milieu qui deviendra solide par refroidissement : glycérine gélatinée par exemple.

Dans le cas où le montage définitif a lieu en milieu fluide, il importe de conserver la préparation soit à plat, soit verticalement, la convexité de la cellule segmentiforme étant tournée vers le bas afin d'éviter un déplacement des microorganismes ainsi concentrés. Il va sans dire que les méthodes que je viens d'indiquer ne sont pas exclusives et peuvent avec avantage être combinées entre elles et avec d'autres. Toutes les fantaisies raisonnées sont laissées au choix de l'expérimentateur.

Lyon, déc. 1944.

Présenté à la Section de Microscopie en sa séance du 20-1-45.