

## ENCEINTE STERILE POUR MANIPULATIONS EN ANAEROBIOSE

M. RAIMBAULT et M. BOUREAU \*

Les enceintes conçues pour l'exécution de travaux en anaérobiose tels que la préparation et l'incubation de plaques gélosées (1, 2) sont disponibles dans le commerce. Ce matériel a l'inconvénient d'être coûteux, de plus il est souvent dépourvu d'un dispositif de stérilisation et ne comporte pas de système de compensation de pression. Cette dernière lacune est la cause de variations de pression gênantes lorsqu'on introduit les mains dans les gants au cours des manipulations.

Nous décrivons ici une enceinte qui possède ces équipements et que nous avons construite au laboratoire sans gros investissements.

L'enceinte (Fig. 1) est réalisée en panneaux d'Altuglas de 5 mm d'épaisseur collés au chloroforme. Son volume est d'environ 250 litres ; celui du sas est de 15 litres. La stérilisation est assurée par deux tubes U. V. La pression intérieure est maintenue égale à la pression atmosphérique au moyen d'un sac de compensation en polyéthylène, matériau qui nous a donné satisfaction mais qu'il serait avantageux de remplacer par un sac en néoprène imperméable à l'oxygène. La stérilisation de l'anse de platine est réalisée par effet Joule dû à un courant électrique provenant d'une batterie de 6 V (1), l'anse fermant le circuit entre deux lames de cuivre. L'intensité du courant est ajustée au moyen d'un rhéostat pour limiter l'échauffement au rouge sombre.

L'oxygène est éliminé au moyen d'un courant d'azote préalablement privé de son oxygène résiduel par passage à travers une série de 12 colonnes de cuivre finement divisé chauffée à 300° C dans un four muni d'une résistance électrique de 1200 W déposée dans un sillon tracé dans une couche de kaolin ; ceci permet l'utilisation d'un gaz industriel très bon marché. Les colonnes ont une longueur de 50 cm et 2 cm de diamètre intérieur. Leur capacité suffit à purifier 250 litres d'azote industriel si celui-ci contient moins de 4 % d'oxygène. Leur régénération se fait rapidement à 300° C par passage d'un mélange d'hydrogène et d'azote purs à volumes égaux (3).

Lors de la première mise en service de la boîte, l'air qu'elle contient est chassé en gonflant avec de l'air un sac en plastique souple placé à l'intérieur. Lorsque le sac occupe tout le volume intérieur, on introduit dans la boîte de l'azote purifié jusqu'à ce que le gaz contenu dans le sac ait été totalement évacué à l'extérieur. Avant cette opération, on aura pris la précaution de vider complètement le sac de compensation et de boucher sa communication avec la boîte.

Les pollutions éventuelles d'O<sub>2</sub> sont ensuite éliminées par un recyclage de l'atmosphère à travers les colonnes de cuivre. Une pompe type Marion dont le débit a été réglé à 5 litres/mn est utilisée à cet effet (Fig. 2).

\* Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM BP 1386 DAKAR, (Sénégal).

10 DEC. 1976

Collection de Référence

Collection de Référence

M  
62 n° - 8436 Bio.Sols

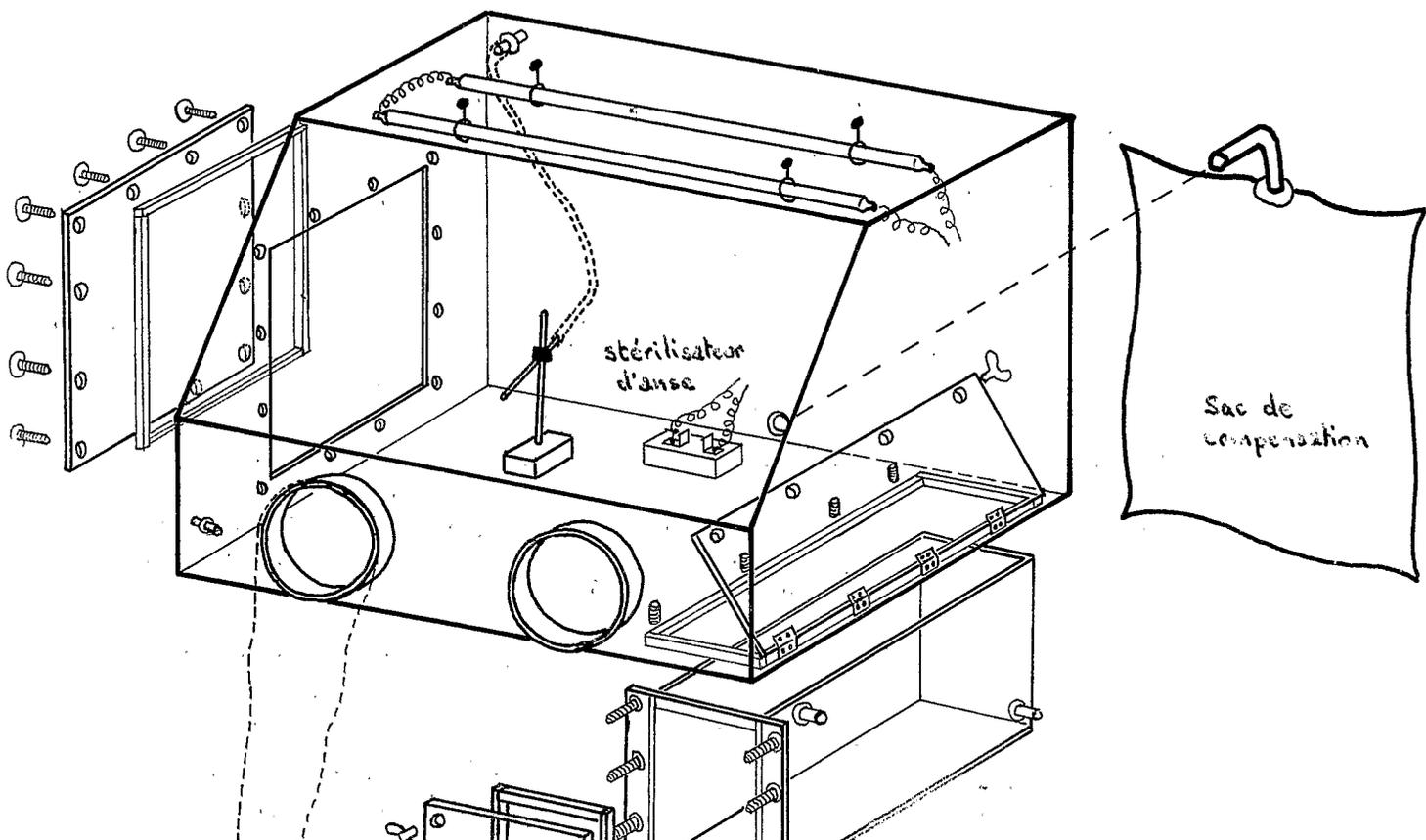


Fig. 1 - L'enceinte et ses accessoires.

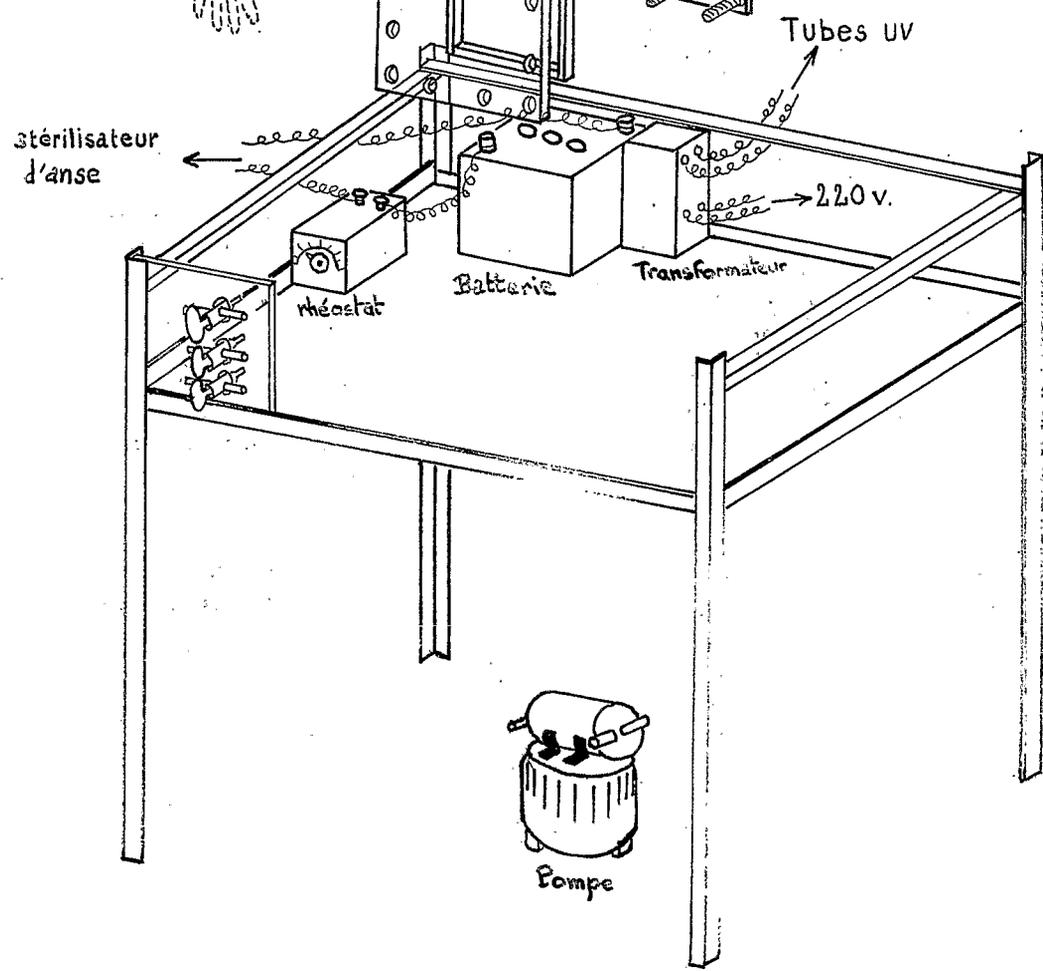
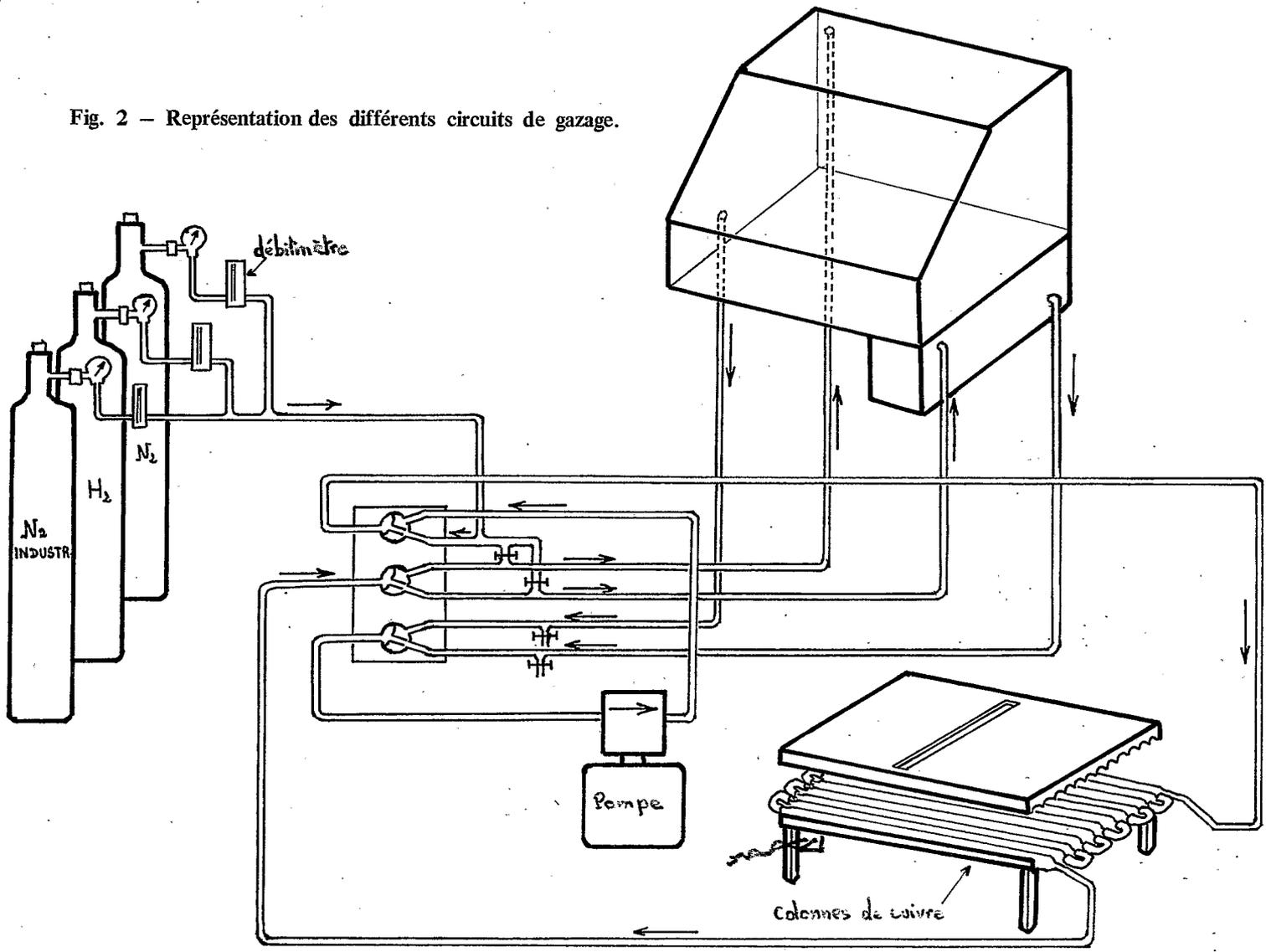


Fig. 2 - Représentation des différents circuits de gazage.



Le contrôle de l'absence d'oxygène peut être effectué soit par analyse chromatographique en phase gazeuse, soit au moyen d'indicateurs chimiques (Gaspak Disposable anaerobic indicator, BBL n° 70504 (USA) ).

Le matériel nécessaire aux manipulations ne doit pas être susceptible de provoquer des pollutions d'oxygène importantes ; pour cela, les flacons à petite ouverture seront préalablement remplis d'un gaz inerte, puis bouchés. Après l'introduction du matériel dans le sas, l'anaérobiose est réalisée dans ce dernier par un balayage à l'azote industriel non purifié durant 15 minutes avec un débit de 5 litres/mn suivi d'une circulation à travers les colonnes réductrices pendant 15 mn. Le matériel est alors introduit dans la chambre de manipulation dont l'atmosphère est recyclée sur les colonnes de cuivre pendant toute la durée des opérations. Le gaz provenant des colonnes pénètre dans l'enceinte par l'intermédiaire d'un système de distribution qui sert à purger l'atmosphère des récipients de culture avant leur fermeture définitive.

Nous avons utilisé ce matériel pour l'isolement et le repiquage de germes anaérobies tels que, des Clostridium et des bactéries méthano-formatrices, mais son utilisation n'est pas limitée aux manipulations sur les bactéries. Cette enceinte peut également convenir à des travaux sur des échantillons biologiques dans tous les cas où la présence d'oxygène doit être évitée.

#### Bibliographie

1. COOKSON, J. T. and BURBANK, N. C. 1965. Isolation and Identification of anaerobic and facultative bacteria present in the digestion process. J. Wat. Poll. Cont. Fed. T 37, 822-841.
2. DRASAR, B. S. and CROWTHER J. S. 1971. "The cultivation of Human Intestinal Bacteria" in : "Isolation of Anaerobes" Edited by Shapton D. A. and Board R. G. p. 93-97.
3. HUNGATE, R. E. 1969. "A roll Tube Method for cultivation of Strict Anaerobes" in "Methods in Microbiology", Edited by Norris J. R. and Ribbons D. W. Vol. 3 B p. 117-132.

#### Résumé :

Une enceinte pour les manipulations en anaérobiose est proposée. L'originalité de cet appareillage est due à la régulation de la pression intérieure, à la stérilisation par tubes U. V. et au dispositif de stérilisation de l'anse. La circulation des gaz à travers une série de colonnes de cuivre réduit permet le maintien de l'anaérobiose et diminue le coût de fonctionnement d'une telle enceinte.

Ce dispositif a été utilisé avec succès pour l'isolement et le repiquage de bactéries anaérobies telles que Clostridium et méthanogènes.

#### Summary :

An anaerobic cabinet is described. The characteristics of this apparatus are the regulation of the inside pressure, the U. V. tubes and the device for the inoculating loop sterilisation. The gases circulation through reduced copper allows to keep the anaerobic conditions and reduces the cost of the utilisation.

This cabinet was used with success for the isolation and maintenance of anaerobic bacteria like Clostridia and methane forming bacteria.