

BIBLIOTHÈQUE
de la
Revue générale des matières colorantes
et des industries qui s'y rattachent

D^r M. NICOLLE
Directeur de l'Institut impérial de bactériologie
de Constantinople.

Matières Colorantes

et Microbes

Avec 40 figures et 1 planche en couleur.



PARIS

~~MASSON~~ DE LA "REVUE" 23, Chaussée-d'Antin.

ET CHEZ MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

120 BOULEVARD SAINT GERMAIN

1899

*Matières colorantes
et microbes*

3412-98. — GONVILLE. Imprimerie E. B. CHERÉ.

BIBLIOTHÈQUE
de la
Revue générale des matières colorantes
et des industries qui s'y rattachent

D^r M. NICOLLE
Directeur de l'Institut impérial de bactériologie
de Constantinople.

Matières Colorantes

et Microbes

Avec 10 figures et 1 planche en couleur.



PARIS
AU BUREAU DE LA "REVUE" 23, Chaussée-d'Antin.
ET CHEZ MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
120 BOULEVARD SAINT-GERMAIN
1899

MATIÈRES COLORANTES

ET MICROBES

L'étude des matières colorantes intéresse le biologiste à deux points de vue essentiellement différents. D'une part, toute recherche microscopique exige presque forcément l'emploi des couleurs naturelles ou artificielles; d'autre part, les animaux et les végétaux produisent des pigments variés dont la formation et les caractères constituent un des chapitres les plus curieux des sciences naturelles.

Au point de vue bactériologique, nous avons donc à envisager : l'emploi des matières colorantes dans l'examen microscopique des microbes — et les fonctions chromogènes des microbes (c'est-à-dire les microbes en tant que producteurs de matières colorantes).

Mais, en dehors de ces deux chapitres, qui rentrent dans la biologie générale, il en est un troisième, bien spécial à la bactériologie, et qui intéresse en même temps l'industrie. Nous voulons parler du rôle des microorganismes dans la formation et les applications de divers produits

6 . MATIÈRES COLORANTES ET MICROBES.

(extrait de Cuba, orseille, cuve d'indigo, etc.).
On trouvera déjà une indication sommaire de ces derniers faits dans la *Revue des matières colorantes* (1897, p. 387).

Notre travail se trouve donc naturellement divisé en trois parties :

Première partie : Emploi des matières colorantes dans l'examen microscopique des microbes.

Deuxième partie : Les microbes producteurs de matières colorantes.

Troisième partie : Rôle des microbes dans la formation et l'application des matières colorantes.

PREMIÈRE PARTIE

EMPLOI DES MATIÈRES COLORANTES DANS L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROBES.

Afin de bien faire comprendre à nos lecteurs les services que rendent les matières colorantes en bactériologie, nous allons être obligé de résumer brièvement les caractères généraux des microbes et de dire quelques mots de leur étude microscopique simple, sans coloration. Nous tâcherons d'être le plus clair possible et de nous limiter au strict nécessaire.

Généralités sur les microbes. — Bactéries. — D'abord, quelle est la signification du mot microbe? Cette expression s'applique à tous les êtres inférieurs, animaux ou végétaux, qui ne peuvent être étudiés sans le secours du microscope.

Le protozoaire de l'impaludisme est un microbe, la levure de bière est un microbe, la bactériodie du charbon est un microbe. Or, le premier appartient au règne animal, les deux autres au règne végétal. La levure est un champignon, la bactériodie une bactérie.

Les *bactéries* constituent le groupe le plus important des microbes, au moins au point de vue médical. Voisines des algues et des champignons inférieurs, elles sont assez malaisées à définir. Nous dirons simplement que ce sont des

organismes très petits, incolores, et jouissant de la propriété de se reproduire par division transversale (fig. n° 1).

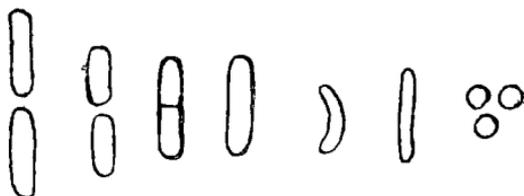


Fig. 1.



Fig. 2.

Un mot de leurs caractères morphologiques et de leur structure. Les bactéries sont rondes (microcoques), longues (bacilles), courbes (vibrions) (fig. n° 2).

Les bacilles courts sont dits bactériums, les bacilles très longs prennent le nom de filaments, les formes courbes complexés se nomment spirilles (fig. n° 3).

Une bactérie comprend comme parties essentielles : la membrane d'enveloppe, plus ou moins nettement différenciée (*m*); le noyau, masse arrondie ou elliptique qui remplit la plus grande partie de l'espace limité par la membrane (*n*); le protoplasma logé entre la membrane et le noyau (*p*) (fig. n° 4).

Dans toute cellule, animale ou végétale, on trouve constamment un noyau et un protoplasma; la membrane d'enveloppe peut faire défaut. Chaque bactérie répond donc à une cellule complète; mais il faut ajouter : à une cellule dont le noyau offre des dimensions énormes et le protoplasme une réduction exceptionnelle

(Comparer fig. n° 5 : cellule type, animale ou végétale).

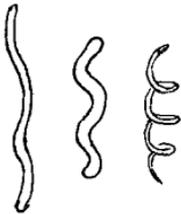


Fig. 3.

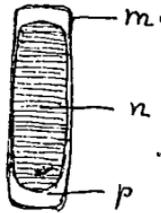


Fig. 4.

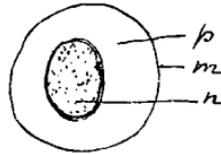


Fig. 5.

Les détails qui précèdent n'ont pu être étudiés que sur certaines bactéries volumineuses ; on les considère comme applicables à toutes les autres pour des raisons tirées principalement des réactions colorantes.

Certaines bactéries sont mobiles. Leur mobilité est due à la présence de cils, identiques aux flagella des épithéliums vibratiles (par exemple, des cellules qui revêtent la muqueuse nasale), des infusoires ciliés et des zoospores de certains végétaux inférieurs.

Chaque cellule microbienne mobile peut porter un ou plusieurs cils diversement insérés (le nombre et le mode d'insertion sont assez constants pour une variété donnée). La figure n° 6 montre divers types de cils.

Quelques bactéries sont entourées d'une capsule, sorte d'atmosphère muqueuse adhérente au microorganisme et souvent caractéristique ; par exemple, le pneumocoque ou agent de la pneumonie vulgaire, lequel représente un diplocoque, c'est-à-dire deux bactéries rondes

généralement associées dans une capsule commune (fig. n° 7).

Enfin, il est des bactéries qui donnent nais-

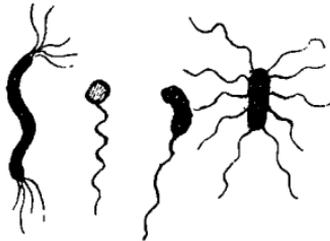


Fig. 6.



Fig. 7.

sance dans leur intérieur à des formes de résistance (endospores) destinées à protéger l'espèce contre les diverses influences destructives. La bactérie charbonneuse est un exemple de bactérie sporulée (fig. n° 8).

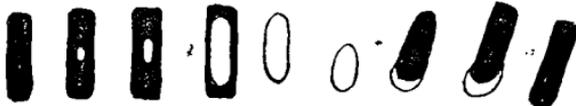


Fig. 8.

Fig. 9.

Les spores peuvent être considérées comme des bactéries à l'état de vie latente. Elles sont limitées par une membrane épaisse, à la manière des graines, et, comme celles-ci, supportent d'ordinaire sans encombre les intempéries, jusqu'au jour où, placées dans des conditions favorables, elles se mettent à germer. En germant, la spore charbonneuse donne une bactérie analogue à celle dont elle provient (fig. n° 9).

Habitat des microbes. — Les microbes sont

universellement répandus dans la nature. Lorsqu'ils vivent aux dépens de la matière morte, on dit qu'ils mènent l'existence saprophytique (microbes des eaux, microbes des fermentations spontanées ou industrielles, microbes cultivés dans les laboratoires, etc.). Lorsqu'ils vivent aux dépens de la matière vivante, on dit qu'ils sont parasites (organismes des diverses maladies infectieuses).

Dans ce second cas, les microbes sont tantôt disséminés dans les humeurs, tantôt contenus dans les globules blancs du sang et de la lymphe. Ceux-ci ont pour rôle de protéger l'organisme contre l'infection en absorbant activement les microbes et les détruisant par une vraie digestion intracellulaire.

Cette fonction défensive, exercée par les globules blancs, porte le nom de phagocytose. Elle a été découverte par M. Metchnikoff (fig. n° 10, bacilles dans un leucocyte).



Fig. 10.

Le rôle phagocytaire n'est d'ailleurs point le seul dévolu aux globules blancs.

Dans la lutte du leucocyte avec le microbe, ce dernier peut aussi avoir le dessus. Qui dit mort dans une maladie infectieuse dit victoire du microbe sur le globule blanc ; qui dit guérison dit destruction du microbe par le globule blanc.

Cette proposition ainsi formulée est un peu trop absolue, mais elle nous paraît bonne cepen-

dant pour schématiser, en passant, l'évolution des maladies infectieuses.

Examen des microbes sans coloration.

— Pendant longtemps on dut se borner à ce procédé d'étude. Si imparfait qu'il paraisse, il a cependant permis de découvrir les agents des principales fermentations et de plusieurs maladies infectieuses.

La plupart des découvertes de Pasteur s'édifiaient sans le précieux concours des méthodes de coloration, encore inconnues. Il est vrai que le fondateur de la bactériologie y savait suppléer par son incomparable puissance d'observation.

Pour étudier une bactérie sans coloration, il suffit de déposer une goutte du liquide qui la contient entre une lame et une lamelle et d'examiner au microscope avec un fort objectif (sec, ou mieux à immersion). Il faut diaphragmer fortement pour ne pas noyer l'image dans une lumière trop intense. La difficulté principale d'observation réside, en effet, dans ce fait que les bactéries ont un indice de réfraction voisin de celui des milieux qui les contiennent habituellement. Comme, d'autre part, elles sont incolores et transparentes, on conçoit que leur recherche soit parfois très malaisée.

Il est évident que si l'on examine une culture où des milliers de bactéries sont rassemblées sous le champ du microscope, la difficulté disparaît (1). Elle reparait entière lorsqu'il s'agit de

(1) Exception faite pour les « microbes invisibles ». Ceux-ci offrent des dimensions de même ordre que les longueurs d'ondes lumineuses et échappent par conséquent à toute espèce d'examen. La connaissance (récente) de

rare individus ; surtout si leurs dimensions sont minimales ou s'ils sont entremêlés de divers éléments des tissus animaux (fragments de cellules plus ou moins dégénérées, granulations, débris de fibres, cristaux, etc.).

Or, ce cas se présente fréquemment dans l'étude des microbes pathogènes. Jadis, on essaya de tourner la difficulté en faisant agir sur la préparation les acides ou les alcalis dilués qui dissolvent nombre des éléments des tissus et respectent les bactéries. Dans la préparation ainsi « éclaircie », on reconnaît souvent mieux les microorganismes. Toutefois, le procédé était pénible et, il faut l'avouer, très incertain. Eberth a cependant pu déceler ainsi pour la première fois le bacille typhique dans le suc des organes lymphoïdes chez les sujets morts de la fièvre typhoïde.

On pourrait encore citer quelques autres découvertes, mais elles constituent des exceptions.

Il faut donc colorer les microbes afin de les voir sûrement et facilement. Cette nécessité, presque absolue pour ce qui est du microbe lui-même, devient indispensable lorsqu'il s'agit des spores, des capsules, et surtout des cils.

Il faut colorer aussi les microbes pour les distinguer des tissus, étudier leurs rapports avec les cellules phagocytaires, enfin, pour les diagnostiquer les uns des autres.

ces organismes est due à MM. Nocard et Roux (microbe de la péripneumonie des bêtes à cornes) et à M. Löffler (microbe de la fièvre aphteuse).

Beaucoup d'affections humaines et animales, dont on n'a jamais réussi à voir l'agent pathogène, sont certainement dues à des « bactéries invisibles ».

L'examen sans coloration ne s'applique plus guère aujourd'hui qu'à la recherche de la mobilité des bactéries.

Pour que cette mobilité se manifeste, il est indispensable que le microbe soit bien vivant, condition incompatible avec la coloration.

On peut dire, en effet, que les bactéries vivantes opposent une résistance énorme, pratiquement absolue, à la pénétration des matières colorantes. On ne les colore qu'après les avoir tuées.

Matières colorantes employées en bactériologie. — C'est avec les couleurs basiques d'aniline qu'on doit colorer les bactéries; les couleurs acides ne conviennent point. Les bactéries, presque entièrement constituées par un volumineux noyau, se comportent en effet comme les noyaux de presque toutes les cellules, lesquels montrent une affinité caractéristique pour les colorants basiques.

Les couleurs basiques les plus employées sont : la fuchsine, le violet dit de gentiane (violet méthyl benzylé, mélangé d'un peu de dextrine ; composé mal défini, mais excellent pratiquement), le bleu de méthylène, la thionine. Après de nombreuses recherches sur ce sujet, nous avons cru devoir nous limiter personnellement à ces quatre colorants. Mais d'autres composés basiques ont été et sont encore mis en usage : violets de rosaniline et de pararosaniline, bleu Victoria, safranine, etc. Ils ne possèdent par eux-mêmes aucun avantage sur les précédents. Et d'ailleurs, en matière de colorations micro-

biennes, c'est la méthode qui prime tout. Les couleurs n'ont que des propriétés de série et (à notre point de vue du moins) les séries sont fort limitées. Le bactériologue ne doit donc pas espérer des « couleurs providentielles » destinées à lui révéler les microbes encore inconnus.

Nous distinguons pratiquement deux sortes de couleurs basiques : celles qui surcolorent (fuchsine, violet de gentiane) et celles qui ne surcolorent pas (bleu de méthylène, thionine). Les secondes peuvent être employées pour teindre directement les microbes, non seulement lorsque ceux-ci se présentent isolés (cultures, liquides en fermentation, etc.), mais encore lorsqu'ils sont contenus dans les humeurs ou les tissus (sang, pus, coupes d'organes, par exemple). Avec les premières, au contraire, on ne peut colorer directement que les bactéries isolées ; dans tout autre cas la coloration, forcément excessive, doit être suivie de deux autres opérations : différenciation et décoloration. C'est la méthode dite indirecte, qui trouve ses indications, comme le procédé direct les siennes.

Les couleurs acides sont réservées à la coloration des humeurs et des tissus, combinée à celle des microbes. Pour notre part, nous ne nous servons que d'éosine et d'acide picrique. Mais d'autres ont fait et font encore usage des violets acides du triphénylméthane, de la tropéoline, de l'aurantia, etc. Parmi les colorants acides, les uns ont une affinité spéciale pour le protoplasma, les autres teignent l'ensemble des préparations d'une manière diffuse. Nous n'em-

ployons les couleurs acides qu'à ce dernier titre ; aussi avons-nous choisi exprès l'éosine et l'acide picrique, parce qu'ils constituent des types de colorants diffus.

Quant aux couleurs naturelles, carmin, hématoxyline (ou mieux hémateïne), nous les réservons à la coloration des tissus. Certains auteurs ont préconisé d'autres colorants naturels, l'orseille et l'orcéine par exemple.

En combinant, à l'aide de méthodes appropriées, la coloration des microbes à celles des cellules de l'organisme, on obtient des résultats absolument parfaits. Nous indiquerons plus tard quelques procédés de double et de triple coloration. Ces procédés sont basés sur l'affinité de certaines couleurs pour certains éléments, affinité qui, suivant la remarque d'Ehrlich, possède dans bien des cas la valeur d'une véritable réaction chimique (Farbenanalyse). Nous nous souvenons encore de l'étonnement du distingué savant, M. Rosenstiehl, auquel nous indiquions en 1893 les principales méthodes usitées à l'Institut Pasteur, et qui nous avoua n'avoir jamais soupçonné le degré de perfection auquel était arrivée sur ce point la technique bactériologique. Il est juste de rappeler ici les noms de Koch, d'Ehrlich, de Unna, de Weigert, de Kühne, de Löffler, de Gram, qui, s'inspirant des méthodes microscopiques déjà connues, mais les élargissant d'abord et les transformant ensuite, ont créé tout le chapitre que nous résu-
mons ici.

Forme sous laquelle on emploie les matières

colorantes. — Qu'on nous permette de ramener un peu cette question, comme toutes les autres, à notre pratique personnelle. Si nous agissons ainsi, ce n'est pas pour critiquer indirectement les procédés d'autrui, mais pour simplifier notre exposé et pouvoir mieux garantir la parfaite exactitude de ce que nous avançons. Les principes généraux, une fois découverts, appartiennent à tout le monde; chacun les adapte à ses habitudes techniques, sans autre prétention. Pour chacun, le meilleur procédé est celui qu'il connaît le mieux.

Voici donc comment nous préparons tous les réactifs nécessaires à nos recherches. Nous faisons d'abord des solutions mères, en dissolvant nos quatre couleurs basiques et nos deux couleurs acides dans l'alcool à 95° G.-L. (dans l'alcool à 50° G.-L. pour la thionine, peu soluble dans l'alcool fort).

Avec ces solutions mères, nous préparons :

1° Deux solutions hydro-alcooliques (*fuchsine* et *bleu de méthylène*) ainsi formulées :

Solution mère.....	10 c. c.
Eau distillée.....	90 —

Au fond ce sont de vraies solutions aqueuses, quant à leurs propriétés ;

2° Trois solutions phéniquées (*fuchsine*, *violet de gentiane*, *thionine*) également très simples :

Solution mère.....	10 c. c.
Eau phéniquée à 1 0/0.....	90 —

3° Une solution alcoolique d'*éosine*, dite au 1/3 :

18 MATIÈRES COLORANTES EMPLOYÉES.

Solution mère.....	10 c. c.
Alcool à 95°.....	20 —

4° Une solution alcoolique très étendue d'*acide picrique* (alcool à 95° G.-L. additionné d'un peu de solution mère d'acide picrique, de façon à obtenir la teinte de l'eau de chlore).

Et c'est tout. Ajoutons pour mémoire une formule de carmin et une d'hématéine.

Carmin (formule de Orth) :

Carmin.....	2 gr. 50
Solution saturée à froid de carbonate de lithine.....	100 gr.

Hématéine (formule de Mayer) :

A. {	Hématéine.....	1 gr.
	Alcool à 95° G.-L.....	50 c. c.
B. {	Alun ordinaire.....	50 gr.
	Eau.....	1 lit.

Chauffer B jusqu'à dissolution de l'alun. Laisser refroidir. Mêler A et B. Filtrer.

Le carmin et l'hématéine doivent être, avons-nous dit, réservés pour la coloration des tissus. De même l'éosine et l'acide picrique, « couleurs de contraste » qui ne servent qu'à faire des « fonds ». Laissons donc momentanément de côté ces deux groupes de composés et indiquons les propriétés des solutions basiques, qui constituent les vrais réactifs tinctoriaux des bactéries.

Ici se pose une question d'ordre général. Un colorant basique étant donné, on peut le dissoudre dans l'eau, la glycérine, l'alcool, un acide dilué, un alcali dilué ; on peut lui asso-

cier diverses substances : phénol, thymol, huile d'aniline, etc. Quelles sont les modifications qu'éprouvera le réactif du fait de ces divers traitements? Voici ce qu'on observe dans la pratique bactériologique :

Les solutions aqueuses concentrées (et, à *fortiori*, saturées) jouissent en général d'un assez fort pouvoir colorant. Conséquence : dans la méthode de coloration directe, employer ou bien des couleurs qui ne surcolorent pas (bleu de méthylène) ou bien des couleurs qui surcolorent, mais en solution étendue (fuchsine). D'où nos deux formules de solutions dites hydro-alcooliques. Pour rendre la solution de bleu de méthylène comparable à celle de fuchsine, on pourrait la formuler plus concentrée, mais cette modification est inutile pratiquement.

Les solutions phéniquées manifestent des propriétés tinctoriales encore plus énergiques. Conséquence : dans la méthode de coloration directe, choisir une couleur qui ne surcolore pas (thionine); dans la méthode de coloration indirecte, choisir au contraire de puissants colorants (fuchsine, violet de gentiane).

L'acide phénique n'est pas le seul composé qui exalte le pouvoir colorant des dérivés basiques. On a employé et on emploie encore l'huile d'aniline (par exemple : eau saturée d'huile d'aniline, 90 c. c.; solution mère de fuchsine, 10 c. c.), le thymol (eau saturée de thymol, etc.) et d'autres composés aromatiques.

Comment agissent ces substances? On a beaucoup discuté à cet égard. Pour les uns, c'est en

concentrant, pour ainsi dire, la solution, en lui donnant une tendance à la précipitation (Vorbereitung zur Ausfällung, de Unna); pour d'autres, en se combinant véritablement aux couleurs pour former un nouveau composé plus énergique; pour certains, en rendant la membrane des microbes plus perméable à la matière colorante, etc., etc. Ce qui nous paraît hors de doute, d'après nos recherches, c'est que le phénol (pour ne citer que lui) favorise la coloration en agissant à la fois sur le microbe et sur la matière colorante. Nous l'employons de préférence à l'aniline (très en vogue cependant) parce que les solutions au phénol sont aussi bonnes que les solutions à l'aniline et se conservent infiniment mieux.

Certains auteurs font usage de solutions colorantes alcalinisées. Ces liquides ne sont pas mauvais, mais ils ne nous ont jamais paru supérieurs aux liquides phéniqués : d'ailleurs ils ne se conservent pas longtemps. On admet que l'alcali ajouté à la matière colorante agit principalement sur le microbe lui-même; c'est fort probable, à notre avis.

Quant aux solutions glycérinées, alcooliques, acidifiées, elles n'ont que des indications limitées; on peut même s'en passer absolument. Nous ne les mentionnons que pour faire une remarque importante. La glycérine, l'alcool, les acides étendus, sont des décolorants. Une préparation teinte, par exemple, à la fuchsine, se décolore progressivement lorsqu'on la traite par l'un de ces réactifs. Pour le même motif,

une préparation colorée à l'aide d'une solution alcoolique, glycinée ou acidifiée de fuchsine, ne se teindra que fort peu (d'autant moins que la dose du décolorant sera plus forte). C'est en somme l'expérience classique de Witt; nous y reviendrons.

Préparation des objets destinés à l'étude microscopique. — L'étude microscopique (après coloration) peut porter sur des liquides en fermentation, des cultures, des humeurs ou tissus pathologiques, etc. Tous ces cas se ramènent pratiquement à deux : l'examen sur lames et l'examen des coupes.

1° Préparation des lames. — Lorsque le produit à étudier offre une consistance liquide ou semi-liquide, rien n'est plus simple que de l'étaler sur une de ces petites lames de verre, dites porte-objets, et connues de chacun. Les lames doivent être très propres et débarrassées de toute trace de matière grasse. Si l'on a affaire à un liquide fermenté ou à une culture en milieu liquide (par exemple une culture dans le bouillon, milieu d'un emploi courant) on en dépose une gouttelette au centre du porte-objet et on laisse sécher à l'abri de la poussière. La dessiccation peut être facilitée par l'emploi d'une chaleur modérée.

La préparation étant sèche, il convient de la fixer. La fixation, opération indispensable, a pour but de modifier chimiquement les microbes en les rendant aptes à subir l'influence des matières colorantes. Non fixées, les bactéries ne se teintent pas ou se teintent très mal.

De plus, la fixation, en insolubilisant les albuminoïdes du corps des microbes et ceux des milieux où ils se sont développés, empêche la formation de précipités lors de la coloration. Ceux-ci rendraient l'examen presque impossible et en tout cas seraient du plus fâcheux effet. Les liquides fixateurs sont pour ainsi dire tous des coagulants (alcool, sublimé, etc.).

Le mélange, à parties égales, d'alcool absolu et d'éther, préconisé par M. le D^r Roux, suffit dans la généralité des cas. Il modifie, dans le sens indiqué, la composition chimique des bactéries sans altérer sensiblement leur forme. On le fait agir quelques secondes. M. Ehrlich recommande, comme moyen fixateur, le chauffage des préparations (sèches) à 110° C. pendant une ou plusieurs heures, procédé excellent, mais très long et inutile dans les circonstances ordinaires. Les fixateurs ne doivent agir qu'après dessiccation complète, sous peine d'altérer profondément les préparations. Ajoutons enfin que la fixation, dans le cas des préparations sur lames, et en tant que phénomène de coagulation, colle véritablement les microbes sur le porte-objet et les empêche de se détacher mécaniquement par l'effet des solutions colorantes.

Nous avons pris comme exemple l'examen d'un liquide fermenté ou d'une culture en liquide. Si l'on se trouve en présence d'une culture sur milieu solide (par exemple une culture sur gélatine, ou bouillon solidifié par l'addition de 10 % de gélatine — sur gélose, ou bouil-

lon solidifié par l'addition de 1,5 % de gélose — sur sérum coagulé, etc.), on délaye une trace de celle-ci dans une gouttelette d'eau placée au centre de la lame et l'on se comporte ensuite comme précédemment.

Supposons maintenant qu'on veuille examiner le sang pris sur un individu ou un animal infectés. On en déposera une goutte à l'extrémité du porte-objet et, à l'aide d'un agitateur, on étalera très rapidement cette goutte qui devra se dessécher presque instantanément. A cette condition, les globules rouges et blancs du sang seront parfaitement conservés dans leur forme. La fixation du sang desséché aura, bien entendu, pour effet d'agir, non seulement sur les bactéries, mais encore sur les éléments cellulaires du sang lui-même.

Au lieu de sang, on pourra étaler sur lames du pus, de la pulpe des viscères, etc., etc. Les frottis d'organes sont d'un emploi presque journalier, car lorsqu'il s'agit de constater simplement la présence des microbes dans tel ou tel viscère, ils dispensent de la préparation des coupes.

2^o *Préparation des coupes.* — Elle est indiquée toutes les fois qu'on veut se rendre compte des rapports exacts des bactéries avec les tissus, et des altérations de ceux-ci sous l'influence de l'infection.

Pour faire des coupes, c'est-à-dire de minces sections dont l'épaisseur moyenne ne doit guère descendre au-dessous de 1/200 de millimètre, bien des méthodes sont actuellement employées.

On peut les diviser en deux principales : tantôt l'objet destiné à être débité sera fixé et durci tel quel, tantôt on l'englobera après l'avoir fixé dans un corps de consistance favorable à la section.

Exemple du premier cas. — Un petit cube de foie charbonneux sera immergé dans l'alcool à 90°-95°. L'alcool fixera et durcira l'organe. Une fois durci, on en fera de fines sections à l'aide d'un des nombreux modèles de microtomes, c'est-à-dire, en dernière analyse, avec un rasoir construit et disposé à cet effet.

Les sections, reçues au fur et à mesure dans un cristalliseur rempli d'eau, seront ensuite reprises et placées sur des lames où on les colorera aisément.

La méthode que nous venons de schématiser n'est employée que rarement ; on lui préfère le procédé des inclusions. Celui-ci permet d'obtenir des coupes bien plus minces et des coupes d'organes impossibles à durcir par l'alcool seul.

Exemple du second cas. — Un fragment de poumon tuberculeux sera immergé dans la solution de Mayer (eau distillée, 100 gr. ; sublimé, 7 gr. ; acide acétique glacial, 1 c. c.), fixateur infiniment supérieur à l'alcool. Après vingt-quatre heures (ou moins si l'objet est très petit), on lavera la pièce à grande eau pour enlever l'excès de sublimé. Puis on la placera dans l'alcool absolu pour la déshydrater. De l'alcool, le poumon passera dans un bain de xylène, puis dans une solution saturée de paraffine dans le xylène (à 37° C.), enfin dans un bain de paraf-

fine fondue (on emploie, suivant les cas, des paraffines fondant de 45° à 50° C.). Il ne restera plus qu'à couler dans un moule une certaine quantité de paraffine au centre de laquelle on aura disposé le fragment de poumon. Puis on laissera se solidifier le tout. Le bloc ainsi obtenu sera disposé sur un microtome spécial qui permet de débiter des coupes extrêmement minces, et même des rubans de coupes accolées comme les anneaux d'un tænia (les rubans sont précieux lorsqu'on veut examiner la totalité d'une production pathologique; dans le cas présent, un tubercule).

Les coupes de poumon (ou plutôt les coupes de paraffine englobant celles du poumon) seront collées sur un porte-objet à l'aide du mélange de Mayer (albumine et glycérine à parties égales). Il ne restera plus qu'à dissoudre la paraffine et à colorer.

La méthode d'inclusion qui vient d'être résumée consiste donc à pénétrer intimement l'objet avec de la paraffine. Pour ce faire, l'objet doit avoir été bien fixé (sinon il ne résisterait pas aux manipulations ultérieures), ensuite privé d'eau par l'alcool absolu, puis pénétré par un dissolvant de la paraffine (xylène), enfin imbibé de paraffine.

Ce procédé est excellent, car il permet de couper très facilement des viscères de consistance molle, comme le poumon, ou des ensembles de viscères (petits animaux, embryons, etc.), sans modifier les rapports des cellules ou des organes entre eux.

De plus, il permet seul d'obtenir des coupes extraordinairement fines. On peut, connaissant son principe, le modifier dans ses détails; nous avons indiqué la variante qui nous paraît la meilleure.

Au lieu de paraffine, on peut avoir recours à d'autres « masses à inclusion », le collodion, par exemple, qui répond à certaines indications.

Rappelons que, dans la préparation des coupes, comme dans celle des lames, la fixation a une importance capitale. Un tissu non fixé, ou même mal fixé, donnerait des coupes absolument impossibles à colorer.

Le meilleur fixateur courant est le sublimé; l'alcool suffit pour les bactéries contenues dans les organes, mais conserve très mal la forme des éléments propres de ces organes. Il va sans dire que le sublimé peut être employé pour les préparations sur lames; mais, grâce à la dessiccation préalable (qui constitue déjà un commencement de fixation, qui fixerait même les frottis si on prolongeait son action plusieurs semaines), on peut se contenter de l'alcool-éther, réactif des plus commodes.

Coloration des bactéries (et des éléments anatomiques) dans les préparations sur lames. — Soit une culture. Si nous voulons mettre simplement en évidence les bactéries qu'elle contient, nous emploierons la méthode dite directe. Si, au contraire, nous nous proposons d'acquérir certaines notions diagnostiques, les méthodes dites indirectes seront nécessaires.

MÉTHODE DIRECTE. — Elle se définit d'elle-

même. En voici un exemple. Une gouttelette de culture du bacille de la morve (1), en milieu liquide, est étalée, fixée et séchée comme il a été indiqué. Puis, sur la lame, on verse un peu de violet phéniqué et on laisse agir quelques secondes. La préparation est ensuite lavée à l'eau au moyen du jet d'une pissette, en évitant de faire tomber celui-ci directement sur la couche colorée. Ce lavage a pour but d'enlever la couleur en excès non fixée sur les bactéries. Il ne reste plus qu'à regarder au microscope, en se servant de l'objectif à immersion (2). Pour rendre la préparation propre à être examinée, on peut recourir à deux procédés. Si l'on ne désire pas conserver la préparation, il suffit de la laisser sécher; on dépose alors une goutte d'huile de cèdre (huile à immersion) sur les parties colorées. Ou bien, après le lavage, on recouvre la préparation d'une lamelle, en ayant soin que l'espace compris entre celle-ci et la

(1) La morve est une affection grave des solipèdes transmissible à l'homme qui en meurt presque toujours. On la diagnostique chez le cheval à l'aide de la malléine, substance extraite des cultures morveuses et analogue à la tuberculine de M. Koch (extraite des cultures de tuberculose).

(2) Nos lecteurs savent que l'étude microscopique des éléments très petits se pratique à l'aide des objectifs à immersion. Ceux-ci déforment beaucoup moins que les objectifs dits à sec, puisqu'au sortir de la préparation les rayons lumineux traversent une huile possédant un indice de réfraction voisin de celui des lames et absolument identique à celui des lentilles de l'objectif. Chaque fabricant de microscopes choisit une huile appropriée à la réfringence de ses verres.

lame reste bien rempli d'eau (sans bulles d'air) et on dépose la goutte d'huile à immersion sur la lamelle. Il y a quelquefois avantage à pratiquer ce mode « d'examen dans l'eau » car il donne des notions plus exactes sur la forme et la dimension des bactéries.

Si l'on désire conserver la préparation, on dépose (après lavage et dessiccation) sur la couche colorée une goutte de baume du Canada dissous dans le xylol et l'on recouvre d'une lamelle. Le xylol s'évapore rapidement et la préparation se trouve ainsi « montée au baume », c'est-à-dire plongée dans une sorte de vernis protecteur. On peut aussi conserver les préparations « à nu », sans baume ni lamelle. Chaque fois qu'on les a examinées, on enlève l'huile de cèdre à l'aide d'un bain de xylol. Les parties colorées se trouvent il est vrai sans protection, mais, en y prenant un peu garde, on se met à l'abri de toute détérioration. Le procédé de conservation « à nu », si commode, offre un avantage sérieux. La couche colorée se trouve soustraite à l'influence du baume, qui jouit de propriétés réductrices et finit presque toujours par détruire plus ou moins complètement les colorations.

Après cette petite digression de technique microscopique, revenons à notre préparation. Au microscope, nous apercevons les bacilles de la morve teints en violet intense et se détachant nettement sur un fond incolore (Pl. fig. 1); le résultat est absolument satisfaisant.

Au lieu du violet, nous aurions pu nous servir de tout autre composé basique, soit surcolorant

(fuchsine), soit ne surcolorant pas (thionine). Mais, comme il s'agit ici de colorer des bactéries isolées, et que le ton violet convient parfaitement à l'examen, on préfère ce mode de coloration.

On emploie au contraire la thionine phéniquée dans le cas suivant. Supposons qu'on veuille étudier le pus d'un bubon chez un malade atteint de la peste. Le pus, étalé et fixé suivant le procédé classique, sera coloré pendant environ trois minutes dans la thionine. Après lavage et emploi d'un des tours de main indiqués plus haut, portons la lame sur la platine du microscope. Nous apercevrons les bacilles de la peste (1) nettement définis dans leur forme, courts, trapus, teintés en violet franc, le plus souvent à leurs extrémités seulement (forme dite en navette); nous apercevrons aussi les cellules du pus avec leurs noyaux colorés en violet foncé et leur protoplasma d'un violet clair ou même incolore. Le tout aura la netteté d'une planche tirée en une couleur (Pl. fig. 2). Si, au lieu de la thionine, nous avons fait usage du violet phéniqué, l'aspect eût manqué de netteté; la coloration, plus massive, n'aurait point souligné les différences d'électivité des éléments multiples présents dans la préparation.

Un dernier exemple de coloration directe. Du sang de poule ayant succombé au choléra des poules (2) est coloré pendant dix secondes dans

(1) Le bacille de la peste a été découvert par le Dr Yersin, ancien préparateur et collaborateur de M. le Dr Roux.

(2) Affection très grave des gallinacés. Étudiée par Pasteur et ses collaborateurs. Le choléra des poules re-

l'éosine alcoolique au tiers, puis lavé à l'eau et traité pendant quinze secondes par la thionine. On prépare et on examine. Les parasites se présentent teintés en violet, souvent, ici encore, sous la forme de navettes; les noyaux des globules blancs et des globules rouges (chez les oiseaux ceux-ci sont, en effet, nucléés) ont également pris la couleur violette. Au contraire, le corps des globules rouges offre un ton rose vif et le protoplasma des globules blancs une teinte rose pâle (Pl. fig. 3).

Dans ce cas, il a été possible, grâce à l'extrême minceur et à la parfaite régularité de la couche étalée, de pratiquer directement une double coloration. Nous avons d'abord fait agir l'éosine (à l'alcool) qui s'est portée sur les éléments pour lesquels elle possède de l'affinité. Le lavage à l'eau a enlevé mécaniquement l'excès de couleur non fixé (le reste ne pouvant d'ailleurs point se dissoudre puisqu'on avait choisi exprès « une couleur à l'alcool »). Puis, nous avons coloré à la thionine qui s'est localisée sur les éléments basophiles. Il faut éviter de prolonger l'action de cette dernière teinture, car elle finirait par altérer l'éosine employée en premier lieu.

MÉTHODES INDIRECTES. — Elles ont pour but de colorer exclusivement une bactérie donnée, ce qui permet de pratiquer sans difficulté des doubles ou même des triples colorations, lorsque cette bactérie siège dans les humeurs ou les

présente la première maladie vaccinée par la méthode pasteurienne. Son étude marque donc une des grandes dates de la bactériologie et de la médecine générale.

tissus. On distingue deux méthodes indirectes principales : celle de Gram (micrographe danois) et celle d'Ehrlich (bactériologue allemand).

Méthode de Gram. — Comme tout procédé indirect, elle comprend trois temps : surcoloration, différenciation, décoloration. Soit à étudier le pus d'un abcès à staphylocoques (Pl. fig. 4) (1), par exemple le pus d'un furoncle. On colore quatre à six secondes par le violet phéniqué; on fait agir, sans laver au préalable et pendant le même temps le liquide de Gram (iode 1 gramme; iode de potassium 2 grammes; eau 300 grammes, ou mieux 200 grammes). Puis on traite par l'alcool absolu additionné d'un sixième d'acétone jusqu'à ce que la préparation paraisse incolore, ou à peine teintée en jaune (ton fugace, dû à l'iode). Au microscope, on n'aperçoit que les staphylocoques, colorés en violet foncé; le reste demeure invisible. Que s'est-il passé? Sous l'influence du violet, la couche de pus a pris un ton violet foncé opaque; microbes et éléments anatomiques, tout s'est surcoloré. Puis la solution iodo-iodurée a fait virer la couleur au noir mordoré. Enfin l'alcool-acétone a dissous cette nouvelle couleur partout, sauf au niveau des microbes. Voici comment on explique le phénomène. La solution

(1) Le staphylocoque, découvert par Pasteur, constitue le plus commun des microbes pyogènes (c'est-à-dire des agents de la suppuration). Il se présente sous la forme de bactéries rondes, souvent agglomérées en amas, qu'on a comparées aux grains d'une grappe de raisin (d'où le nom de staphylocoques).

iodo-iodurée forme avec le violet de gentiane un dérivé iodé qui possède une forte affinité pour certaines bactéries (dans le cas présent, les staphylocoques) et une affinité faible pour les autres éléments. Un dissolvant, comme l'alcool-acétone, décolorera donc facilement ces derniers en respectant les microbes.

En un mot, le liquide de Gram « différencie » les bactéries du reste de la préparation. Quelle que soit la théorie admise, le fait est hors de doute. Si, après avoir surcoloré le pus par le violet, nous avons décoloré immédiatement par l'alcool-acétone, le résultat eût été tout autre. Au début de la décoloration, le protoplasme des cellules aurait d'abord perdu sa coloration ; puis peu à peu, les noyaux des cellules et les bactéries auraient pâli de plus en plus (à peu près parallèlement) et finalement se seraient décolorés. La solution iodo-iodurée a donc entravé la décoloration des microbes et favorisé celle des cellules (principalement des noyaux, parties les plus résistantes). De plus, elle a donné aux bactéries un ton noirâtre absolument différent de la teinte propre du violet de gentiane.

La méthode de Gram, d'un usage courant en bactériologie, a fait l'objet de nombreux travaux. On l'a modifiée à l'infini (le procédé indiqué est celui que nous avons trouvé le meilleur) ; on l'a expliqué aussi de bien des manières.

Elle comprend évidemment trois facteurs :
1^o Le microbe envisagé. Toutes les bactéries ne restent pas colorées par la méthode de Gram, ou, comme on dit en argot bactériologique, « ne

prennent pas le Gram ». Prennent le Gram : la bactérie charbonneuse, le bacille de la diphtérie, celui du rouget du porc, celui du tétanos, le streptocoque (dont nous dirons quelques mots plus loin), le pneumocoque, etc... Ne prennent pas le Gram : le bacille typhique, celui de la morve, celui de la peste, celui du choléra des poules, le vibrion cholérique, etc... Le bacille tuberculeux et celui de la lèpre se colorent par la méthode de Gram, mais d'une façon discontinue, « en pointillé », étant composés de parties alternantes dont les unes prennent et les autres ne prennent point le Gram ; 2° la couleur employée. D'après Unna, seuls les dérivés basiques de la pararosaniline (violets divers, bleus Victoria, etc.) permettent de réussir le procédé. Cette opinion, contestée par Neisser, paraît cependant bien conforme à la réalité des faits ; 3° le liquide iodo-ioduré. Agissant par l'iode libre, comme l'a montré Unna. De toutes les préparations iodées, la solution de Gram est celle qui convient le mieux ; elle semble en effet céder au violet la quantité d'iode la plus convenable pour sa transformation.

On peut en somme admettre, sans risquer de se perdre dans les théories, que l'iode convertit les pararosanilines en composés doués d'une affinité toute spéciale pour certains microbes et dénués d'affinité réelle pour les éléments anatomiques et les autres microbes. Cette manière de voir constitue plutôt une description des faits qu'une théorie véritable ; elle n'en est que meilleure, croyons-nous, dans l'état actuel de la science des colorations.

Revenons à notre préparation du pus où les staphylocoques restent seuls colorés, et faisons agir maintenant rapidement la solution (alcoolique) d'éosine au tiers. Le « reste » de la préparation prendra une teinte de contraste et nous aurons ainsi une double coloration. Il est d'autres façons de pratiquer cette dernière. On peut colorer à l'éosine alcoolique avant de « faire le Gram » ; incorporer de l'« éosine à l'eau » au liquide iodo-ioduré (procédé de Mérieux), etc.

La double coloration (Gram et éosine) permet d'obtenir de très belles préparations de sang infecté (Pl. fig. 5 : sang de cobaye charbonneux ; bactériidies colorées en violet noirâtre, globules rouges du sang teintés en rose vif).

La méthode de Gram, ne s'appliquant qu'à un certain nombre de bactéries, manque par cela même de généralité, mais acquiert une certaine valeur diagnostique. Le fait de constater qu'un microbe prend ou ne prend pas le Gram constitue souvent un indice précieux (1).

Lorsque deux bactéries coexistent dans un produit pathologique, et que l'une d'elles seulement prend le Gram, on peut les distinguer aisément au moyen de la double coloration. Supposons le cas d'un pus urétral dans lequel se rencontrent à la fois deux microcoques ; l'un décolorable par le Gram, le gonocoque (agent de la blennorragie), l'autre colorable, le staphy-

(1) On pratique donc souvent la coloration de Gram dans le cas d'une culture étalée sur lame. Il nous a paru superflu d'en donner un exemple, puisque nous avons indiqué les principaux microbes qui prennent le Gram.

locoque. Pareille association microbienne constitue un fait banal. Nous colorons d'abord la préparation par le procédé de Gram; puis, après action de l'alcool-acétone et lavage à l'eau, nous traitons par la fuchsine hydro-alcoolique (une demi-minute environ). Résultat: staphylocoques violets (ils prennent le Gram), gonocoques rouges (ils se décolorent par le Gram et se recolorent par la fuchsine). Dans le cas présent, nous avons substitué la fuchsine à l'éosine, car cette dernière, en tant que colorant acide, ne manifeste aucune affinité pour les bactéries.

De plus, nous avons choisi une solution fuchsinée de pouvoir colorant modéré pour ne pas altérer la coloration primitive des staphylocoques; la fuchsine phéniquée aurait été trop active et se serait plus ou moins substituée au violet (1).

Ces quelques exemples feront comprendre, nous l'espérons, l'importance et les grands avantages d'une méthode journallement employée.

Un autre procédé, qui s'applique à tous les microbes résistant au Gram, a été préconisé dernièrement par le Dr Claudius. Il consiste à traiter les préparations par le violet 6B, puis par une solution aqueuse d'acide picrique; on décolore par le chloroforme ou l'essence de girofle. Ici c'est l'acide picrique qui joue le rôle de différenciateur.

(1) La coloration de Gram, suivie de la teinture par l'éosine ou la fuchsine, représente donc l'emploi successif des méthodes indirecte et directe.

Méthode d'Ehrlich. — Elle ne s'applique qu'à deux microbes, celui de la tuberculose et celui de la lèpre, organismes qui affectent du reste la même forme. Mais leur disposition respective au sein des tissus, le fait que, contrairement au bacille lépreux, le bacille tuberculeux est cultivable et inoculable aux animaux, permettent de ne jamais les confondre. La méthode d'Ehrlich, très limitée, possède donc une haute valeur diagnostique.

Voici comment on la pratique, d'après la modification de Kühne.

Soit un crachat tuberculeux. Nous le colorons dix minutes à froid par la fuchsine phéniquée (ou une minute à chaud en portant la lame au-dessus d'une petite flamme, sans atteindre l'ébullition qui endommagerait la préparation). Puis nous lavons à l'eau. Nous faisons agir rapidement une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate d'aniline et nous décolorons par l'alcool absolu jusqu'à ce que ce dernier n'enlève plus de fuchsine. Dans la couche étalée, seuls les bacilles de Koch (nom donné au bacille tuberculeux pour rappeler sa découverte par le célèbre bactériologue allemand) ont conservé leur couleur. Faisons agir, maintenant, la solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène pendant une demi-minute; lavons et examinons. Les bacilles tuberculeux se détachent nettement en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (Pl. fig. 6). Ce fond comprend les divers éléments cellulaires constituant le crachat notamment

les globules blancs venus de la lésion bacillaire du poumon, et aussi les très nombreux microbes, soit associés aux bacilles tuberculeux, soit récoltés par le crachat dans son trajet au travers des premières voies respiratoires et digestives (1). Dans la méthode de Kühne, le chlorhydrate d'aniline agit en différenciant le bacille de Koch; il entrave la décoloration du bacille tuberculeux, en même temps qu'il favorise celle des autres éléments. Une préparation teinte à la fuchsine, et traitée immédiatement après par l'alcool, ne donnerait absolument rien comme résultat, car l'alcool décolorerait insuffisamment et sans élection les éléments associés au bacille tuberculeux.

Celui-ci, comme l'a bien fait voir Ehrlich, offre deux caractères qui le distinguent des autres bactéries (sauf celle de la lèpre); il prend plus difficilement et garde plus énergiquement les matières colorantes. Pour le teindre, il faut employer un surcolorant énergique et faire agir celui-ci longtemps ou à chaud; pour décolorer les autres éléments de la préparation, on peut employer des agents de différenciation énergiques qui ne respectent que le bacille de Koch.

Dans la « méthode primitive » d'Ehrlich, on emploie comme différenciateur l'acide nitrique au tiers. Le résultat est le même qu'avec le chlorhydrate d'aniline, mais l'aspect de la réaction varie. La préparation, traitée par la fuch-

(1) Ici encore nous avons fait usage successivement des procédés indirect et direct.

sine, ne montre aucune modification apparente lorsqu'on fait agir le chlorhydrate d'aniline; si l'on fait agir, au contraire, l'acide nitrique, elle vire au jaune (formation d'un sel multi-acide), pour redevenir rouge dès qu'on a versé l'alcool absolu.

Les deux caractères fondamentaux des bacilles tuberculeux et lépreux, résistance à la coloration, résistance à la décoloration, sont dus à la teneur de ces microbes en substances grasses. Le fait a été mis hors de doute par des expériences nombreuses sur lesquelles nous ne pouvons insister.

La méthode d'Ehrlich a été modifiée de cent façons, en variant le colorant, l'agent de différenciation ou les deux. Ces modifications n'offrent aucun avantage sur les procédés indiqués ci-dessus.

Coloration des bactéries (et des éléments anatomiques) dans les coupes. — Mêmes méthodes seulement avec quelques variantes.

MÉTHODE DIRECTE. — On ne l'emploie, bien entendu, que si le microbe étudié ne prend ni le Gram ni l'Ehrlich. Car elle ne permet point de colorations combinées, et, par cela même, ne met jamais aussi bien en évidence les bactéries (parfois très peu nombreuses) que contiennent les tissus. C'est, en somme, une méthode de pis aller.

Soit à colorer le bacille typhique dans la rate d'un sujet mort de fièvre typhoïde. La coupe,

englobée dans sa lamelle de paraffine, a été bien collée sur le porte-objet. On dissout la paraffine avec quelques gouttes de xylène ; on enlève le xylène par l'alcool absolu et on colore à l'aide de la thionine (une minute suffit). On lave à l'eau, on déshydrate à l'alcool absolu, on remplace l'alcool par le xylène, lequel « éclaircit » la préparation, et on « monte au baume ». La préparation est alors examinée.

Elle montre, à côté des éléments de la rate, colorés en violet plus ou moins foncé, selon leur affinité pour la thionine, des amas de bacilles typhiques parfaitement teintés (Pl. fig. 7).

Nous avons dit, tout à l'heure, que le xylène éclaircissait la coupe de rate typhique. En effet, après lavage, la préparation, quoique fort bien colorée, garde toujours une certaine opacité. On peut néanmoins l'examiner dans l'eau. Mais si, après déshydratation, on la traite par le xylène, elle acquiert une transparence parfaite, infiniment plus favorable à la recherche des bactéries. Comme l'a fait remarquer Koch, en matière de préparations colorées « l'image de forme » doit céder le pas à l'« image de couleur ». On comparera ce que nous venons de dire avec le cas des préparations sur lames, étudiées tantôt dans l'eau, tantôt dans le baume.

Il va sans dire que les préparations conservées à nu se comportent comme celles qui sont montées au baume, puisqu'elles ne contiennent pas trace d'eau. L'huile à immersion les « éclaircit ».

Méthode de Gram. — Nous voulons colorer le

streptocoque (1) dans le foie d'un lapin inoculé avec ce microbe. Pour bien mettre en relief non seulement les organismes, mais encore les éléments du foie, nous pratiquerons une triple coloration. Les coupes, passées dans le xylène, puis dans l'alcool, seront colorées un quart d'heure dans le carmin de Orth et lavées ensuite à l'eau. Cela fait, nous pratiquerons le Gram comme d'habitude (2). Nous traiterons enfin rapidement par l'alcool picrique et nous monterons au baume après déshydratation. L'examen au microscope permettra de voir les streptocoques teintés en violet foncé, les noyaux des cellules du foie et des globules blancs (situés dans les vaisseaux) en rose, le protoplasma des cellules du foie en jaune (Pl. fig. 8) : le carmin s'est localisé dans les noyaux, le violet dans les bactéries, l'acide picrique dans le protoplasma. Voilà un exemple typique de l'affinité de divers éléments pour divers colorants.

Méthode d'Erhlich. — On peut, à l'aide de cette méthode, obtenir aussi des triples colorations (violet, carmin, acide picrique). Nous préférons cependant un procédé de coloration double (hématéine et fuchsine), qui donne ici de

(1) Agent de l'érysipèle, de la fièvre puerpérale, de diverses suppurations, etc., etc. C'est un microcoque dont les grains s'agencent d'ordinaire en chaînettes (d'où son nom). Découvert par Pasteur.

(2) En substituant toutefois l'alcool-acétone au tiers à l'alcool-acétone au sixième. Une coupe, différant d'un frottis sur lame en ce qu'elle est toujours mieux fixée, prend plus énergiquement les couleurs et doit être plus fortement décolorée.

meilleures définitions. Une coupe d'organe tuberculeux est traitée pendant deux minutes par l'hématéine, puis lavée. On pratique ensuite le Kühne d'après le procédé habituel. Une fois montée au baume, la préparation nous montrera les bacilles de Koch teints en rouge vif et les tissus en violet. L'hématéine s'est localisée sur les tissus (surtout sur les noyaux, le reste n'étant que faiblement, mais suffisamment teinté en violet); la fuchsine sur le bacille tuberculeux (Pl. fig. 9) : on y remarque la situation constante des bacilles dans les globules blancs ou dans les cellules géantes. Celles-ci constituent de gros éléments à noyaux très nombreux qui résultent de la fusion de plusieurs globules blancs « associés » pour capter et digérer le bacille de Koch. Les cellules géantes ne sont pas spéciales à la tuberculose; on les retrouve dans diverses maladies chroniques : morve, syphilis, etc.

Coloration des spores. — Elle offre de grandes analogies avec la coloration du bacille tuberculeux. Les spores, formations très résistantes à tous les agents physiques et chimiques, résistent beaucoup aussi à la coloration. Il faut donc surcolorer. Une fois teintes, elles gardent assez énergiquement la matière colorante : on peut donc se servir ici encore des acides forts.

En conséquence, le procédé d'Erhlich se trouve indiqué. Nous employons habituellement la méthode de Möller, qui n'en diffère guère que par l'emploi de l'acide chromique comme « modificateur » de la spore à colorer.

Nous n'osons dire comme mordant, la valeur de ce mot étant encore si discutée entre ceux qui veulent le restreindre à certaines réactions spéciales et ceux qui l'étendent évidemment outre mesure. D'ailleurs, c'est une affaire aux spécialistes et non à nous autres, teinturiers par simple occasion.

Nous ne connaissons, somme toute, qu'une minorité de bactéries sporulées : les bacilles du charbon, du tétanos, du charbon symptomatique (1), le vibrion septique (2), etc. Pour les autres, la spore n'a jamais pu être mise en évidence, ce qui ne veut point dire qu'elle n'existe pas.

Prenons comme exemple la bactériodie charbonneuse. Dans les cultures artificielles, dans la nature (3), elle donne facilement des spores ; dans l'organisme des animaux infectés, elle n'en produit jamais (4). Soit donc une culture charbonneuse sporulée. Nous en faisons un

(1) Affection grave des bovidés, due à un microbe anaérobie (c'est-à-dire ne se développant qu'à l'abri de l'oxygène). Étudiée par MM. Arloing, Cornevin et Thomas (de Lyon) qui en ont découvert la vaccination.

(2) Organisme de la septicémie expérimentale, découvert par Pasteur et Joubert. C'est aussi un anaérobie.

(3) L'existence de la spore charbonneuse (Koch) et sa formation dans le sol au niveau des cadavres charbonneux enfouis rendent compte de l'extrême danger de certains pâturages, et expliquent la persistance presque indéfinie du germe bactériodien en ces endroits. (Pasteur et ses collaborateurs.)

(4) M. le Dr Roux a pu créer artificiellement une race de bactériodie dite asporogène, laquelle conserve toutes ses propriétés, sauf celle de donner des formes de résistance.

frottis sur lame et nous traitons pendant trois minutes par l'acide chromique (solution aqueuse à 5 ‰). C'est la « préparation ». Nous lavons, puis nous colorons à chaud dans la fuchsine phéniquée (en chauffant une minute au-dessus d'une petite flamme, sans atteindre l'ébullition). Après lavage, nous différencions dix secondes dans l'acide sulfurique à 5 ‰. Nous lavons encore, et recolorons par le bleu de méthylène pendant une demi-minute. Au microscope, les spores se montrent colorées en rouge vif. Un certain nombre sont encore contenues dans l'intérieur des bactériidies, et leur volume variable dénote un degré variable de développement; les autres sont déjà libres. Le corps des bactériidies s'est teint en bleu (couleur de contraste); il s'est comporté vis-à-vis de la spore comme les divers microbes des crachats se comportent vis-à-vis du bacille tuberculeux qu'ils accompagnent (Pl. , fig. 10).

La méthode directe et la méthode de Gram teignent le corps des bactériidies, mais non les spores. Celles-ci apparaissent alors comme de petites masses arrondies ou ovalaires, se détachant en clair sur le fond violet du microbe qui les contient.

Coloration des cils. — Entre les bacilles tuberculeux et lépreux et les spores d'une part, les diverses bactéries de l'autre, il n'y a en somme que des différences quantitatives dans les réactions colorantes.

Pour certains auteurs, cela tiendrait, dans le premier cas, à une moindre perméabilité de la

membrane cellulaire ; pour d'autres, à une condensation différente du protoplasma : peu importe. Mais, entre la constitution des cils et celle de la substance même des bactéries, il y a certainement plus qu'une affaire de degré. En effet, on ne peut colorer les cils qu'après les avoir « préparés » (les bactériologues disent volontiers mordancés) au moyen des liquides tanniques. Pas de bonne méthode de coloration, pas de méthode sûre et générale qui n'emploie le tannin sous une forme ou une autre.

Le procédé d'élection est celui de Löffler (1) que nous employons avec quelques modifications.

Supposons que nous voulions colorer les cils du bacille typhique. Une dilution de culture sur milieu solide sera étalée et séchée sur lame (inutile de fixer). Nous la traiterons ensuite par l'« encre de fuchsine » de Löffler, ainsi formulée par son auteur :

Solution aqueuse de tannin à 20 pour 80.	10 c. c.
Solution aqueuse saturée à froid de sulfate ferreux.....	5 c. c.
Solution saturée de fuchsine dans l'alcool absolu.....	1 c. c.

Pour ce faire, on déposera sur la préparation une grosse goutte d'encre de fuchsine et on chauffera quelques secondes sur une petite flamme ; dès qu'apparaîtront des vapeurs, on lavera ; on recommencera deux à trois fois l'opé-

(1) Bactériologue allemand auquel on doit un travail remarquable sur les cils des bactéries. Très connu également pour ses recherches sur la diphtérie, la morve, etc.

ration (mordançage et lavage). Puis, on colorera avec la fuchsine phéniquée pendant une quinzaine de secondes et on examinera au microscope. Les bacilles apparaîtront entourés d'un véritable chevelu de cils, au nombre de huit à douze dans les exemplaires « complets ». Un certain nombre de cils, en effet, sont arrachés ou altérés lors de l'étalement de la culture sur lame; le fait tient à l'extrême fragilité de ces organes locomoteurs (Pl. , fig. 11) — on trouvera dans la même figure l'image des cils du vibron cholérique; ou plutôt du cil, car celui-ci est unique et inséré à l'une des extrémités de la bactérie virgulaire).

M. Van Ermengen a imaginé, pour la mise en évidence des cils, une méthode très ingénieuse, mais qui constitue une « imprégnation » et non une coloration véritable. Après avoir « préparé » les cils par le tannate d'osmium, il fait agir une solution de nitrate d'argent, puis un liquide réducteur (tannin, acide gallique, acétate de soude). Les résultats sont de toute beauté.

Coloration des capsules. — Prenons comme type le pneumocoque (1), qui présente dans les humeurs des animaux inoculés des capsules extrêmement nettes. (Quelques autres bactéries partagent avec lui cette propriété de s'entourer d'une atmosphère glaireuse.) Pour voir nettement les capsules dans le sang du lapin mort

(1) Découvert par Pasteur qui lui donna le nom caractéristique de « microbe à auréole ». Étudié ensuite par M. le Dr Talamon, médecin des hôpitaux de Paris.

de septicémie pneumococcique, il suffit de colorer quatre à six secondes dans le violet phéniqué, puis de traiter très rapidement par l'alcool-acétone au liers. On aperçoit alors les microbes teints en violet foncé et entourés d'un halo violet pâle (Pl. fig. 12).

On a proposé plusieurs autres méthodes. Rappelons seulement celle qui fait usage de violet additionné d'acide acétique (1 %). Le réactif colorant, ainsi tempéré par un agent de décoloration, donne d'emblée une différenciation des microbes et des capsules (à condition toutefois que la couche étalée sur lame soit mince et parfaitement régulière). En augmentant ou diminuant la dose d'acide acétique, on obtiendra des décolorations ou des surcolorations exagérées ; c'est toujours l'expérience de Witt. Le colorant se trouve « entraîné » tantôt du côté des éléments organiques, tantôt du côté du dissolvant.

Nous en avons fini avec la première partie de ce travail. Forcé de passer rapidement en revue les colorations microbiennes, nous n'avons cherché ni à être complet, ni à faire la moindre théorie. Il nous a semblé que cet article devait représenter simplement la conversation que nous pourrions avoir avec un de nos lecteurs, si celui-ci venait nous demander de lui indiquer « en deux mots » les méthodes de coloration des bactéries. Malheureusement, ces notes écrites ne sauraient remplacer la moindre explication donnée de vive voix au laboratoire.

DEUXIÈME PARTIE

LES MICROBES PRODUCTEURS DE MATIÈRES COLORANTES.

Généralités. — Les bactéries, disions-nous au commencement de cet article, sont absolument incolores. Certaines d'entre elles n'en sécrètent pas moins des pigments variés, extérieurs à la cellule microbienne, tantôt solubles dans les milieux de culture et s'y diffusant, tantôt insolubles et restant accolés aux organismes qui les ont produits.

L'étude de ces pigments est encore peu avancée. Leur composition chimique demeure inconnue ; leurs rapports avec les couleurs « artificielles », n'ont jamais été approfondis ; leur utilisation par l'industrie (possible — peut-être — dans certains cas) n'a été indiquée qu'à propos du *bacillus prodigiosus*.

Il serait injuste toutefois de méconnaître l'intérêt des recherches de M. Gessard sur les bacilles pyocyanique et cyanogène ; de M. Schottelius, de Wasserzug et de M. Scheurlen sur le *bacillus prodigiosus*. Grâce à ces auteurs, nous avons appris à connaître les conditions et variations de la fonction pigmentaire chez certaines espèces. Il est à souhaiter que de tels travaux se multiplient et que, parallèlement à l'étude physiologique, on aborde franchement

le côté chimique de la question. Le sujet en vaut la peine à tous égards et nous pensons que, malgré ses difficultés, il reste très captivant.

Le plus grand nombre des bactéries forme sur les milieux de culture des colonies blanchâtres ou grisâtres, qui jaunissent ou brunissent plus ou moins en vieillissant; il ne s'agit pas là de coloration au sens vrai du mot. Certaines bactéries, au contraire, donnent des cultures primitivement et nettement teintées; ce sont les vraies bactéries chromogènes.

Une même espèce microbienne peut posséder des variétés colorées à côté d'une race incolore. Ainsi, les staphylocoques (agents de la suppuration, dont nous avons déjà dit quelques mots) revêtent communément trois types: *albus*, *aureus*, *citreus*, qui ne diffèrent que par la teinte des colonies; leurs propriétés pathogènes sont identiques et on peut les rencontrer associés deux à deux dans un même pus. M. Neumann dit avoir vu se produire sous ses yeux la transformation de l'*aureus*, tantôt en *albus*, tantôt en *citreus*, tantôt en une variété rose. Certaines colonies de cette dernière variété ont repris — toujours spontanément — la teinte dorée. Avec d'autres bactéries chromogènes, le même auteur aurait constaté des phénomènes analogues.

Dans le groupe des sarcines — microcoques qui se divisent dans trois directions de l'espace, de telle sorte que chaque individu en produit huit, formant par leur groupement une sorte de petit ballot cubique — on trouve les va-

riétés *alba*, *aurantiaca*, *citrina*, *fusca*, *flava*, *incarnata*, *rosea*, *sulfurea*, *livida*, etc...

Inutile d'indiquer d'autres exemples. Pour donner une idée de la multiplicité des couleurs produites par les bactéries, passons rapidement en revue les classes (purement morphologiques) dans lesquelles on peut artificiellement les ranger : microcoques, bacilles et vibrions.

Les microcoques fournissent des pigments variés. La couleur la plus répandue est le jaune; puis vient le rouge; les autres sont plus rares. Citons quelques types.

Couleur jaune crème (*micrococcus cremor-des* E.); jaune citron (*diplococcus citreus liquefaciens* P.); jaune soufre (*micrococcus ochroleucus* U.); jaune sale (*micrococcus citreus* E.); jaune brun (*micrococcus decidens* E. et A.).

Couleur orangée (*micrococcus aurantiacus* E.).

Couleur rose chair (*micrococcus carneus* E.); rouge rosé (*micrococcus agilis* E.); rouge cerise (*micrococcus cerasinus siccus* E.); rouge cinabre (*micrococcus cinabareus* E. et A.);

Couleur sépia (*micrococcus fuscus* E.);

Couleur violette (*micrococcus violaceus* E.);

Couleur verte, avec fluorescence (*diplococcus fluorescens* N.).

Parmi ces microcoques, les uns viennent de l'air (A.), ou des eaux (E.); les autres ont été recueillis sur la peau normale (P.), dans les fosses nasales (N.) ou isolés de l'urine (U.).

Les bacilles sécrètent fréquemment aussi des couleurs. Les teintes les plus communes sont le jaune, le rouge et le vert fluorescent; les

tons bleus ne sont pas exceptionnels. Quelques exemples :

Couleur jaune crème (*bacillus arborescens* E.); jaune citron (*ascobacillus citreus* P.); jaune soufre (*bacillus flavocoriaceus* E.); jaune doré (*bacillus aureus* E. P.); jaune de Naples (*bacillus helvolus* E.); gomme gutte (*bacillus fulvus* E.); jaune sale (*bacillus spiniferus* P.);

Couleur ocre (*bacillus ochraceus* E.); couleur orangée (*bacillus luteus* E.);

Couleur brune (*bacillus brunneus* E.); couleur sèpia (*bacillus mesentericus fuscus* A.);

Couleur rouge (*bacillus prodigiosus* et types voisins); rose (*bacillus mycoides roseus* T.); rouge brun (*bacillus rubidus* E.); rouges divers (*bacillus lactis erythrogenes* L.; *bacillus mesentericus ruber* T.);

Couleur verte, avec fluorescence. Bacille pyocyanique et types voisins; bacille cyanogène; bacille de la diarrhée verte des enfants, etc...

Couleur violette (*bacillus violaceus* E.); bleu violet (*bacillus janthinus* E.); violet foncé à reflets métalliques (*bacillus membranaceus amethystinus* E.).

Couleur bleu foncé (*bacillus cæruleus* E.); bleu noir (*bacillus lividus* E.); indigo (*bacillus berolinensis indicus*).

Ces bacilles ont des provenances variées. Nous les avons indiquées à l'aide des mêmes abréviations que pour les microcoques (de plus : T = terre; L = lait).

Parmi les vibrions chromogènes, on peut citer : le *vibrio aureus* (E. et A.), jaune doré ;

le *vib. flavescens* (E. et A.), jaune sale : le *vib. flavus* (E. et A.), jaune ocre ; et un vibriion bleu turquoise isolé par nous de certaines eaux de Constantinople. Ajoutons enfin le *spirillum rubrum*, car les spirilles appartiennent, comme les vibrions, aux bactéries curvilignes.

Un groupe intéressant de microorganismes jadis rattaché aux bactéries, et maintenant classé parmi les champignons inférieurs, le groupe des streptothrix (caractérisé par la forme rameuse des cellules microbiennes), offre de nombreux types chromogènes. Nous citerons l'*actinomyces*, agent d'affections pseudo-tuberculeuses du bœuf, de l'homme et du porc, dont les cultures, configurées à la manière des lichens, passent du jaune soufre au vert bronze, puis au noir ; le *streptothrix* d'Eppinger (trouvé dans une pseudo-tuberculose de l'homme) à la teinte briquetée ; le *strept. du Pied de Madura* (variété de lymphangite observée surtout dans les Indes) qui sécrète un pigment d'un rouge fuchsine avec reflets métalliques. Enfin, divers *streptothrix*, l'un parasite : *s. aurea* ; les autres non parasites : *s. violacea*, *carnea*, *aurantiaca*, *albidoflava*, etc. dont le nom caractérise suffisamment la nuance.

Le bacille de la tuberculose doit être considéré aujourd'hui comme un *streptothrix*. Il donne des colonies le plus souvent grisâtres ou jaunâtres, mais parfois d'un rose saumoné ou d'un rouge brique.

Les levures, formes simplifiées des champi-

gnons inférieurs, possèdent aussi des types chromogènes (levures rose, brune, noire).

En regard de tous ces organismes, producteurs de couleurs, mais cependant incolores (un seul bacille, le *bacillus erythrosporus* posséderait des spores rougeâtres), il convient de citer le groupe des sulfobactéries, microbes qui vivent dans les eaux sulfureuses et contiennent, cette fois-ci dans leur intérieur, un pigment rose pourpre, la bactério-purpurine, dont le rôle semble assez analogue à celui de la chlorophylle des végétaux. Le groupe des sulfobactéries — dont nous ne pouvons aborder l'étude si intéressante — est du reste purement artificiel : il comprend de volumineuses bactéries et des algues véritables.

Après avoir jeté un coup d'œil d'ensemble sur les divers microbes chromogènes, il conviendrait d'envisager à un point de vue général les caractères et la formation des pigments bactériens. Malheureusement, avons-nous dit, les documents sont encore trop peu nombreux pour autoriser la moindre conception synthétique. Voici tout ce qu'on peut dire dans l'état actuel de la science.

Les bactéries chromogènes sécrètent tantôt une, tantôt plusieurs couleurs.

Ces pigments, de nature mal connue, mais certainement assez variée (1), paraissent dans

(1) La pyocyanine serait une base voisine des ptomaines, la matière colorante du bacillus cyaneofuscus un corps identique à l'indigo, le pigment du staphylocoque doré un lipochrôme, etc.

certains cas identiques aux dérivés acides artificiels (exemple : la matière colorante du bacillus prodigiosus). Lorsqu'ils jouissent d'un pouvoir tinctorial, celui-ci se montre toujours faible.

Les pigments bactériens sont secrétés vraisemblablement à l'état de leucodérivés ; dans tous les cas ils se décolorent facilement sous l'influence des réducteurs. Leur production est intimement liée à la composition du milieu de culture et à sa réaction ; elle ne se manifeste qu'entre certaines limites de température ; enfin elle fait défaut en l'absence d'oxygène (cultures dans le vide ou dans les gaz inertes) (1). De même qu'on peut modifier la virulence d'un microbe, de même on peut modifier ses propriétés chromogènes. Si la bactérie produit un seul pigment, on la transformera en race incolore ; si elle en fournit plusieurs, on agira simultanément ou isolément sur ceux-ci. Les modifications ainsi obtenues sont transitoires ou permanentes ; elles peuvent être considérées comme des schémas parfaits de toutes les transformations qu'on peut imprimer artificiellement aux microbes ; ainsi, une bactérie rendue incolore, correspond dans un autre ordre de faits à une bactérie rendue avirulente.

Pour mieux faire comprendre tous ces phé-

(1) Comme à toute règle il y a au moins une exception, on ne s'étonnera pas de voir le *spirillum rubrum*, contrairement aux autres chromogènes, ne sécréter son pigment qu'à l'abri de l'air.

nomènes, nous allons passer en revue les trois organismes chromogènes les mieux étudiés : *bac. pyocyanique*, *bac. cyanogène* et *bac. prodigiosus*.

Bacille pyocyanique ou « bacille du pus bleu » ; mauvaise appellation, car ce sont les pansements et non le pus qui offrent la coloration bleue ou bleu verdâtre caractéristique.

De tout temps on a remarqué cette teinte anormale que prend parfois le linge des blessés. Sédillot montra (1830) que la présence d'une suppuration n'est pas nécessaire pour la production du phénomène. Chalvet (1860) pensa que la coloration était due à des algues microscopiques. Fordos (1860) isola des pansements bleus la pyocyanine à l'état cristallisé et décrivit ses réactions. Ce n'est que plus tard (1882) que M. Gessard découvrit le bacille pyocyanique.

Celui-ci a été rencontré non seulement dans les pansements bleus, mais encore dans l'eau, l'air, le sol; sur la peau normale, dans la bouche et l'estomac; dans les voies respiratoires et digestives des animaux sains (*vie saprophytique*).

On l'a vu donner chez l'homme des inflammations des séreuses, des entérites, des otites moyennes, etc., et même des septicémies (*vie parasitaire*).

C'est un organisme mobile, très polymorphe. Dans les milieux acides, il revêt l'aspect de longs filaments, parfois de vrais spirilles; dans les milieux additionnés d'antiseptiques, il affecte les formes les plus monstrueuses.

Le bacille pyocyanique fournit un exemple frappant de la multiplicité des sécrétions que peut produire un microbe. Il sécrète en effet : une matière glaireuse, qui donne aux cultures leur viscosité — un composé odorant, rappelant le parfum fade de certaines fleurs — un antiseptique volatil (se confondant peut-être, mais non sûrement, avec le corps odorant), susceptible d'empêcher, même à distance, le développement de la bactériidie charbonneuse, — des diastases, qui lui permettent de digérer la caséine, la sérine et la gélatine, — une toxine, par laquelle il agit sur l'organisme des animaux infectés, — enfin trois pigments : la pyocyanine ; le pigment vert fluorescent ; le pigment verdâtre non fluorescent.

L'étude de ces trois pigments est l'œuvre de M. Gessard, dont nous allons résumer les intéressantes recherches.

Dans le bouillon peptonisé (à 1 ‰), le pyocyanique produit la pyocyanine et le pigment vert fluorescent, — dans l'albumine d'œuf, le pigment vert fluor. seul, — sur la gélose glycélinée (bouillon peptonisé à 1 ‰, glycéliné à 4 ‰ et solidifié par addition de 1,5 ‰ de gélose), la pyocyanine et le pigment verdâtre, — dans l'eau peptonisée (à 1 ‰) et glucosée (à 2 ‰), le pigment verdâtre seul.

La pyocyanine (pigment bleu cristallisable) est soluble non seulement dans l'eau, mais encore dans le chloroforme. Les acides la transforment en un composé rose soluble dans

l'eau et insoluble dans le chloroforme. On utilise ces propriétés pour extraire la pyocyanine des cultures en bouillon. Celles-ci sont traitées par CHCl_3 qui dissout la pyocyanine. Le pigment vert fluorescent reste en solution dans le bouillon que l'on décante. Comme, en dehors de la pyocyanine, CHCl_3 a pu dissoudre des matières grasses, on verse au-dessus de lui une certaine quantité d'eau acidulée et on agite; la pyocyanine, transformée en pigment rose, passe en solution dans l'eau. On décante cette eau, on l'alcalinise et on dissout la pyocyanine, régénérée, à l'aide de CHCl_3 . En recommençant ce traitement plusieurs fois, on obtient finalement une solution chloroformique de pyocyanine pure qu'on laisse cristalliser par évaporation. La pyocyanine se conserve bien en solution acide; en solution alcaline ou en cristaux, elle s'oxyde à l'air et jaunit (transformation en pyoxanthose [Fordos]). Les réducteurs la décolorent. C'est ce qui arrive constamment pour les cultures en bouillon. Celles-ci offrent une teinte jaunâtre (légèrement fluorescente), qui passe au bleu vert (très fluorescent) par simple agitation. Le microbe produit la pyocyanine et le pigment vert fluorescent, et, immédiatement après, les réduit en vertu de son avidité pour l'oxygène. Il est, en effet, très aérobie et ne pousse presque pas dans le vide où il se montre d'ailleurs incapable de sécréter ses pigments.

Le pigment vert fluorescent n'est pas, comme la pyocyanine, un produit spécial au bacille pyocyanique. Un grand nombre d'autres microbes en

fournissent à l'état isolé ou associé à un autre pigment. La production du vert fluorescent est liée à la présence des phosphates dans le milieu de culture. Si ceux-ci font défaut, la couleur n'est sécrétée qu'en très faible proportion. La fluorescence disparaît par les acides et reparait par les alcalis, comme celle de l'esculine. Le pigment traverse mal la bougie Chamberland, où d'ailleurs il s'oxyde en partie, se transformant en pigment feuille-morte (non fluor.) Pareille transformation se voit régulièrement dans les vieilles cultures. Le pigment verdâtre non fluorescent n'offre rien de bien intéressant. Comme la pyocyanine, il traverse facilement le filtre de terre cuite. Dans les anciennes cultures, il donne par oxydation un pigment rouge brun.

M. Gessard a montré que, grâce à certains artifices, on peut modifier à volonté les fonctions chromogènes du bacille pyocyanique et créer ainsi de véritables *races*. Il donne le nom de race A au pyocyanique normal, sécrétant dans le bouillon la pyocyanine et le pigment vert fluorescent. La race P, uniquement pyocyanogène (c'est-à-dire ne fournissant que de la pyocyanine dans le bouillon), s'obtient en cultivant pendant un an le bacille pyocyanique dans l'albumine d'œuf. Il n'y donne, avons-nous vu, que du pigment vert fluorescent. Cependant, reporté en bouillon après ce long temps, il cesse d'y sécréter le pigment vert et ne produit que de la pyocyanine. Tout se passe donc comme s'il s'était tellement habitué à

l'albumine qu'il ne pût désormais fournir de pigment fluorescent sur un autre milieu. La race F, uniquement fluorescigène (c'est-à-dire ne sécrétant que du pigment vert dans le bouillon), s'obtient en chauffant cinq minutes à 57° une culture de la race A; ou bien, encore, en ensemençant dans le bouillon un peu de sang d'un lapin infecté par la race A. La race S (incolore dans le bouillon) s'obtient en chauffant cinq minutes à 57° une culture de la race F ou en ensemençant dans le bouillon le sang d'un lapin infecté par la race F (1).

Il est à noter que les races F et S, reportées sur la gélose glycéinée (milieu d'épreuve), reprennent les caractères de la race A. Elles n'étaient donc devenues anormales que par rapport au bouillon.

Le bacille pyocyanique est pathogène pour certains animaux (cobaye, lapin, rat, souris); il agit sur eux par la toxine qu'il sécrète.

Bacilles fluorescents divers. — Ils sont très nombreux; citons seulement: celui de la diarrhée verte des nourrissons; le *bacillus fluorescens* et le *bacillus erythrosporus* (isolés des eaux); le *bacillus fluorescens liquefacens* (isolé des eaux et de diverses matières en putréfaction); et le *bacillus fluorescens putidus* (isolé des eaux) sur

(1) Tous les échantillons de pyocyanique ne se prêtent pas aussi facilement à la création des races P, F, S, que celui dont M. Gessard s'est servi dans ses expériences. C'est du moins ce que nous avons observé sur trois types étudiés à ce point de vue. Le fait n'enlève d'ailleurs rien à l'intérêt des travaux de M. Gessard.

lequel M. Dieudonné (de Berlin) a fait de curieuses expériences. A 22° (température *optima*), le *bacillus fluorescens putidus* pousse abondamment, en sécrétant son pigment. A 35°, il se développe moins richement et produit des colonies incolores. Après dix-huit passages à 35° on obtient des cultures vigoureuses et colorées. Si l'on cultive alors le bacille à son ancienne température *optima* (22°), il y végète et ne fournit plus de pigment. C'est là un exemple frappant d'adaptation expérimentale.

Bacille cyanogène, « bacille du lait bleu. » — Le phénomène du lait bleu, bien décrit par Reiset, consiste dans l'apparition, à la surface du lait, d'une coloration d'un bleu pur, tantôt continue, tantôt discontinue (en anneau; en pointillé; sous forme de marbrures, rappelant celles du savon de Marseille). Cette coloration est due à un pigment insoluble dans les dissolvants ordinaires, non modifié par les acides, virant au rouge par les alcalis (Braconnot). Le bacille qui le sécrète est petit, mobile, aérobie. Dans le lait stérilisé, il donne une couleur grise qui rougit par les alcalis et bleuit par les acides (sans jamais présenter le ton franc observé dans le phénomène naturel). En bouillon, il fournit du pigment gris et du pigment vert fluorescent.

Par cultures successives en albumine, on obtient une race grise, c'est-à-dire une race qui dans le bouillon ne sécrète que le pigment gris. En chauffant la race normale, on crée une race fluorescigène. Enfin, en chauffant celle-ci, on arrive à une race incolore.

M. Gessard, auquel on doit les recherches qui précèdent, a donc transformé le bacille cyanogène dans le même sens que le pyocyanique ; les résultats sont absolument superposables.

Le phénomène naturel est dû au développement concomitant (dans le lait) du bacille cyanogène (qui fournit le pigment gris) et du bacille lactique (qui, grâce à l'acide qu'il produit, fait virer au bleu le pigment gris). Il est difficile de réaliser expérimentalement la culture mixte des deux microbes en les maintenant dans le rapport de croissance nécessaire à la production du bleu pur. On reproduit, au contraire, l'aspect du phénomène naturel, si l'on cultive le bacille cyanogène dans du lait additionné de 2 % de glucose et de 1 % d'un lactate. L'acide lactique du lactate « met en train » la production du bleu ; l'acide lactique, dû à la scission des molécules de glucose sous l'influence du bacille cyanogène, maintient ensuite la teinte invariable (1).

Bacillus lactis erythrogenes et un coccus récemment décrit par M. Keferstein produisent le « phénomène du lait rouge » ; un bacille « du lait noir » a été mentionné par M. Gorini.

Bacillus prodigiosus. — L'apparition de « taches de sang » sur les divers aliments semble avoir été notée dès la plus haute antiquité. On l'a toujours interprétée comme un phénomène sur-

(1) Le bacille cyanogène fait fermenter le glucose, mais non le lactose. C'est pour cela que dans le lait il ne saurait produire la coloration bleue sans l'aide du ferment lactique.

naturel et de fort mauvais augure. Au moyen âge, on vit assez souvent les hosties devenir sanguinolentes. Un tel événement était regardé comme le signe non équivoque de la colère divine et, pour calmer celle-ci, le massacre des Israélites paraissait tout indiqué. Aussi, comme l'a fait spirituellement remarquer M. Scheurlen, le *prodigiosus*, microbe inoffensif par lui-même, joua jadis indirectement un certain rôle pathogène.

Les « taches de sang » se manifestaient d'ailleurs le plus souvent sous la forme d'une épidémie. On constatait avec effroi que dans un village, un quartier, tout ou partie des aliments se maculait mystérieusement; et cela, parfois durant des semaines entières. Une des dernières épidémies, celle de Legnaro, près de Padoue (1819), fut d'abord inutilement combattue par des exorcismes, puis étudiée avec fruit à l'aide des méthodes scientifiques. Le D^r Sette devina qu'il s'agissait d'un parasite, entrevit même le *prodigiosus* et ses mouvements, fit des cultures sur diverses substances alimentaires, et réunit une commission de chimistes qui isolèrent la matière colorante et montrèrent qu'elle peut se fixer sur les étoffes. L'étude de Sette, oubliée aujourd'hui, dénote un rare esprit d'observation.

En 1848, le célèbre micrographe Ehrenberg découvrit le microbe et lui donna le nom qu'il porte, pour rappeler son passé fabuleux.

Le *prodigiosus* est très répandu dans la nature (air, eau, sol). Il affecte la forme d'un ba-

cille, parfois si court qu'on l'avait jadis considéré comme un microcoque, ailleurs assez long pour mériter le nom de filament. Plus le milieu de culture est favorable, plus la forme est brève; plus il est défavorable, plus elle s'allonge (milieux acidifiés, milieux additionnés d'antiseptiques, etc... comme pour le pyocanique).

Le *prodigiosus* est doué de mouvements (il semble toutefois y avoir des races immobiles). Il pousse aisément sur les divers milieux, notamment sur ceux qui sont riches en amidon. On s'explique ainsi son développement « spontané » sur les hosties, dans les sacristies humides et suffisamment chaudes (le germe vient alors de l'air). L'ensemencement de rondelles de pain azyme avec une trace de *prodigiosus* donne lieu, en effet, à un développement exubérant du parasite. Il y forme un dépôt d'un rouge sanglant. La même coloration se manifeste sur les milieux de culture habituels; à la longue, le pigment, de plus en plus foncé, se recouvre d'une pellicule à reflets métalliques fuchsinoïdes.

Le *prodigiosus* sécrète : une matière glaireuse, de la triméthylamine disent certains auteurs; de l'ammoniaque et un peu de monoéthylamine pour M. Scheurlen (1); — des diastases qui digèrent la gélatine et la sérine; — le pigment caractéristique. Celui-ci ne diffuse jamais dans les milieux

(1) Deux brevets concernant le *prodigiosus* ont été pris, il y a quelques années; l'un se rapporte à la production des ammoniacs composés, l'autre à celle du pigment. Nous ne croyons guère au succès industriel du « microbe sanglant ».

de culture. Il est, en effet, insoluble dans l'eau, le bouillon, etc. ; il se dissout, au contraire, dans l'alcool, l'éther, le xylol, la térébenthine, l'huile d'olive, CS², l'acide acétique, etc.

Pour l'extraire, on gratte la couche développée sur un milieu solide ; on la dessèche ; on l'épuise par l'alcool acidifié ; on précipite par l'eau et on recueille le dépôt. Ce dépôt représente un produit impur, ne contenant ni Ph ni S, et paraissant dépourvu d'Az (Scheurlen).

Le pigment jaunit par les alcalis, passe au rouge violet par les acides et se décolore par les réducteurs. Il teint la laine et la soie ; la couleur, agréable quoique assez pâle, résiste à la lessive, mais disparaît vite à la lumière.

Le *prodigiosus* donne spontanément des colonies blanches, mêlées aux colonies colorées. On peut obtenir des races incolores par cultures successives à 37° (la température *optima* étant 24°) (1) ; par cultures successives dans des milieux très alcalins ou additionnés d'antiseptiques. Ces races sont généralement peu stables ; reporté dans des conditions favorables, le microbe donne à nouveau son pigment. A l'abri de l'air, la couleur rouge fait défaut. En somme, une température peu élevée, une légère acidité du milieu et une aération suffisante sont nécessaires au *prodigiosus* pour sécréter sa matière colorante.

Un certain nombre de bactéries, décrites sous

(1) M. Dieudonné a cependant adapté le *prodigiosus* à la température de 35°.

des noms différents, ne sont que des variétés du microbe que nous étudions. Exemples : l'organisme trouvé par M. Auché dans des sardines altérées au cours de leur préparation, et par M. du Bois Saint-Sévrin dans le panaris d'un homme qui travaillait à ces conserves. L'organisme en question ne sécrète de matière colorante qu'à 38°-40° (à la manière du *prodigiosus* modifié par M. Dieudonné). M. Loir (à Tunis) a rencontré dans d'autres « sardines rouges » qui avaient occasionné plusieurs empoisonnements, une variété de *prodigiosus* fournissant un pigment insoluble dans l'alcool. Enfin, M. Santori (à Rome) a isolé d'une septicémie des poules une bactérie dont la couleur rouge est soluble à la fois dans l'alcool et dans l'eau. Cette bactérie se montre pathogène pour la poule, le lapin, le cobaye, la souris. On pourrait encore citer plusieurs autres bacilles qui représentent de simples races du *prodigiosus*.

Microbes lumineux. — Avant de terminer cette seconde partie de notre article, signalons l'existence des bactéries phosphorescentes. Cette existence n'a rien qui doive nous étonner, puisque nous savons déjà qu'il y a des organismes fluorescents. Les microbes lumineux ont été isolés des eaux (eau de mer, eau des fleuves, principalement au voisinage de leur embouchure), dont ils produisent de temps en temps la phosphorescence. On en compte de nombreuses variétés, provenant des divers points du monde. La phosphorescence, tantôt d'un blanc pur, tantôt jaunâtre, verdâtre ou bleuâtre, exige certaines

conditions pour se manifester dans les cultures. Il faut : 1° un milieu convenable, généralement riche en NaCl, par exemple du bouillon de poisson salé à 3 % et solidifié par addition de 10 % de gélatine. On a pu cultiver directement les microbes lumineux sur des poissons cuits; 2° une température à peu près analogue à celle des eaux d'où l'on a isolé les organismes, tantôt de 5° à 10°, tantôt de 10° à 20°, tantôt de 20° à 30°, et plus; 3° la présence de l'oxygène, c'est-à-dire une bonne aération des cultures. Nous ne pouvons insister davantage sur l'histoire de ces curieuses bactéries, car elle nous entraînerait tout à fait en dehors de notre sujet.

TROISIÈME PARTIE.

ROLE DES MICROORGANISMES DANS LA FORMATION ET L'APPLICATION DE CERTAINS COLORANTS NATURELS.

Les microbes, lorsqu'ils se développent dans un milieu approprié, en modifient profondément la constitution. De nouveaux corps apparaissent, dont l'origine reconnaît trois causes différentes : 1° comme conséquence de leur nutrition, les bactéries abandonnent certains résidus ; 2° en vertu de leur pouvoir fermentatif, elles disloquent les molécules de divers composés ; 3° par leurs propriétés sécrétoires, elles donnent naissance à des produits multiples : diastases, toxines, etc. (1).

La genèse des matières colorantes (sous l'influence des bactéries) résulte tantôt d'une fermentation, tantôt d'une sécrétion véritable : dans le premier cas, la couleur est engendrée par la décomposition d'un corps nettement défini ; dans le second, elle est édifiée par le microbe aux dépens de matériaux nutritifs *variables* qu'on met à sa disposition. Exemples :

(1) Pour toutes les questions qui se rapportent à la physiologie générale des bactéries, nous renvoyons nos lecteurs au *Traité de microbiologie* de M. Duclaux, directeur de l'Institut Pasteur, où le sujet est traité avec une grande hauteur de vues.

l'indigo et l'orcéine sont produits par dislocation de composés préexistants, appartenant à la classe des glucosides. Le mécanisme est comparable, en somme, à celui des fermentations alcoolique, lactique, butyrique, etc. Au contraire, les pigments des diverses bactéries chromogènes doivent leur origine à un acte synthétique, tout comme les diastases, et, vraisemblablement aussi, les toxines.

Dans la seconde partie de cet article nous avons donc étudié les *sécrétions pigmentaires* caractéristiques de plusieurs bactéries. Nous allons montrer maintenant la naissance de matières colorantes sous l'influence du rôle fermentatif de certains microbes. Ce rôle est du reste absolument contingent. Les microbes de l'indigo et l'orcéine ne produisent les couleurs correspondantes qu'en présence de la matière fermentescible spécifique (1); et, de même qu'il y a une grande variété de ferments lactiques, il doit exister nombre de ferments de l'indigo et l'orcéine.

Les idées qui précèdent sont de notion courante en bactériologie. Il n'en faut pas moins savoir gré à M. Czapek de les avoir nettement mises en relief dans sa récente communication

(1) On peut donc dire schématiquement que l'*élément spécifique* est représenté : pour les couleurs dues aux bactéries chromogènes, par le microbe lui-même; et pour l'indigo et l'orcéine par le glucoside. Dans le premier cas, la formation du pigment est relativement indépendante des substances qui constituent le milieu de culture; dans le second, elle est relativement indépendante de la nature de l'organisme-ferment.

à la « Société autrichienne pour le développement des industries chimiques ». Il a pu le faire avec d'autant plus d'autorité que ses recherches sur la fermentation de l'orseille venaient confirmer d'une façon éclatante les résultats obtenus par M. Alvarez avec l'indigo. M. Czapek a fait voir également que la fermentation améliore les propriétés colorantes des divers bois de teinture — exemple le jaune de Santiago, dérivé par fermentation partielle de l'extrait de Cuba (1).

Autant les microbes chromogènes nous semblent actuellement éloignés de toute application industrielle, autant les ferments susceptibles de former ou d'améliorer les matières colorantes nous paraissent dignes de toute l'attention des spécialistes.

Nous espérons le démontrer par l'étude de l'indigo et de l'orcéine. Passant ensuite à un ordre de fait absolument différent, nous indiquerons le rôle que jouent les bactéries dans la teinture en indigo.

Fermentation de l'indigo. — Les seules données précises que nous possédions sur ce sujet sont dues à M. Alvarez (1887). Ce savant a montré que, sous l'influence d'un ferment découvert par lui, la « matière première » de l'indigo (glucoside encore mal connu) se disloque en donnant naissance au produit coloré. (En réalité, la fermentation engendre de l'indigo blanc soluble, qui bleuit et devient insoluble au con-

(1) *Rev. gén. des Mat. col.*, 1897, p. 337. j

tact de l'air.) Lorsqu'on abandonne à elle-même une macération de feuilles d'*indigofera* dans l'eau stérilisée, la couleur apparaît sous forme d'une pellicule bleue à la surface du liquide ; en même temps, il se dégage des bulles de gaz et la température s'élève. Il y a en somme fermentation véritable ; le glucoside est décomposé, le sucre détruit, et le principe colorant mis en liberté. Le ferment provient des feuilles d'*indigofera*, mais il n'y existe pas seul. Il faut donc l'isoler. C'est ce qu'a fait M. Alvarez. Il a vu que, parmi les divers microbes déposés sur les feuilles par les poussières, un seul possède le pouvoir de donner naissance à l'indigo. Du moins, dans ses expériences, n'a-t-il rencontré qu'un seul ferment indigogène ; il est fort probable qu'il en existe d'autres. Le microbe d'Alvarez (*bacillus indigogenus*) appartient au groupe des bacilles encapsulés, groupe qui comprend de très nombreux organismes (pathogènes et saprophytes) les uns vraiment identiques, les autres plus ou moins différents, mais toujours voisins. Citons comme exemples : le pneumobacille de Friedländer (rencontré dans certaines affections pulmonaires) ; le bacille de l'ozène (inflammation atrophique de la muqueuse nasale avec odeur fétide) ; le bacille du rhinosclérome (maladie spéciale à certains pays, et caractérisée par une induration progressive de la muqueuse nasale et des muqueuses voisines). On a rencontré des bacilles encapsulés dans l'air, le sol, les eaux. Chose singulière, ils paraissent constants dans l'encre de Chine. En

somme, il s'agit d'un type bactérien excessivement répandu et généralement doué d'un grand pouvoir fermentatif vis-à-vis des sucres.

Ensemencé à l'état de culture pure dans une décoction stérile de feuilles d'*indigofera*, le bacille d'Alvarez détermine la formation d'indigo. Le bacille de Friedländer, celui du rhinosclerome et un bacille (encapsulé? Alvarez ne le dit pas) isolé des selles se comportent de même.

Il serait de la plus haute importance — aujourd'hui surtout — de reprendre les travaux de M. Alvarez et d'appliquer les méthodes bactériologiques à la production de l'indigo. Est-il besoin de rappeler quels avantages ont constamment obtenus les diverses industries de la fermentation lorsqu'elles se sont inspirées des idées de Pasteur ?

Fermentation de l'orseille. — Nous suivrons ici les intéressantes recherches de M. Czapek (1898). La « matière première » de l'orcéine est représentée par un glucoside, l'éther diorsellinique de l'érythrite. Sous l'influence de la fermentation, l'érythrite est détruite et l'acide diorcellinique ramené à l'état d'orcine. Cette orcine se transforme enfin en orcéine (principe colorant) par oxydation en milieu ammoniacal.

Jadis on préparait l'orcéine en faisant fermenter l'orseille additionnée d'urine putride. M. Czapek a répété l'expérience et s'est convaincu que le ferment provenait de l'urine et non point de l'orseille. En se servant de milieux de culture additionnés de 1 % de carbo-

nate d'ammoniaque, il a réussi à isoler du liquide fermenté un microbe aérobie, rappelant par sa forme le *bacillus subtilis* (organisme qui se développe en voile à la surface des infusions de foin ou de paille) et qui constitue l'agent formateur de l'orcéine. Ce microbe (*bacterium orceinicum*), ensemencé à l'état de pureté dans une décoction d'orseille additionnée de glucose, de peptone et carbonate d'ammoniaque — décoction stérilisée bien entendu — provoque l'apparition d'orcéine.

Dans la fermentation de l'*indigofera*, nous avons pu distinguer deux actes successifs : l'un microbien, qui aboutit à la genèse de l'indigo blanc ; l'autre chimique, qui consiste dans la transformation de l'indigo blanc en indigo bleu par oxydation. Pareillement, dans la fermentation de l'orseille on assiste d'abord à la production de l'orcine (acte microbien) puis à sa transformation en orcéine par oxydation en milieu ammoniacal (acte chimique). Cette transformation constitue d'ailleurs une condition *sine qua non* de la vitalité du bacille de Czapek. En effet, l'orcine représente un véritable antiseptique, et si elle ne se métamorphosait pas, aussitôt produite, en orcéine (corps inoffensif) le microbe périrait et la fermentation cesserait.

Le *bacterium orceinicum* n'est probablement pas l'unique organisme capable de faire fermenter l'orseille. C'est tout au moins le premier connu, et l'étude qu'en a faite M. Czapek offre à tous égards le plus grand intérêt.

Rôle des bactéries dans la teinture en

indigo. — Pour teindre en indigo, il faut ramener l'indigo bleu à l'état d'indigo blanc, c'est-à-dire le réduire. On y parvient à l'aide d'une série de procédés chimiques bien connus et aussi par d'autres méthodes qui consistent à provoquer une fermentation butyrique au sein de la cuve. C'est uniquement au point de vue « fermentation » que nous allons nous placer dans le court exposé qui suit.

La fermentation butyrique a été découverte par Pelouze et Gélis. Mais c'est aux travaux fondamentaux de Pasteur qu'on doit la connaissance du vibrion qui la produit (1861). Le vibrion de Pasteur fut ensuite étudié par divers auteurs, entre autres M. Prazmowski et M. Van Tieghem. Il constitue le type d'une famille de microbes qui compte de nombreux représentants, notamment le bacille amylozyme de M. Perdrrix et le *bacillus orthobutylicus* de M. Grimbert.

Toutes ces bactéries sont anaérobies et sporulées, c'est-à-dire qu'elles ne se développent qu'à l'abri de l'air; et que, dans l'intérieur des bâtonnets, il se produit à un moment donné des formes de résistance. Tandis que le bâtonnet ne résiste pas à une température de 58° à 60°, la spore qui en procède supporte sans inconvénients un degré voisin de l'ébullition (il faut immerger les spores pendant cinq minutes dans l'eau bouillante pour les tuer).

Le vibrion de Pasteur fait fermenter les sucres, les matières amylacées, certaines celluloses (1),

(1) D'où son rôle : dans la digestion des fourrages chez les herbivores, dans le rouissage du lin, dans la sépara-

le lactate de chaux. Le bacille de Perdrix n'attaque ni le lactate de chaux, ni la cellulose. Le bacille de Grimbert diffère du précédent en ce qu'il produit de l'alcool butylique normal.

Les trois microbes donnent de l'acide butyrique, des acides volatils (variables selon les cas), CO^2 et H. C'est en vertu de la formation d'hydrogène naissant qu'ils jouent le rôle de réducteurs énergiques.

On rencontre les ferments butyriques dans le lait fermenté, le vieux fromage, la choucroute, le jus de betteraves; à la surface des végétaux et de leurs graines, etc...; ils sont universellement répandus.

Ensemencés dans un milieu privé d'air, ils se développent facilement; ensemencés dans un milieu aéré, mais en couche profonde, ils commencent à pousser au niveau des parties inférieures, dégagent alors CO^2 et H et se répandent peu à peu dans toute la masse à mesure que l'oxygène se trouve remplacé par des gaz inertes. Les sucres, en vertu de leur pouvoir fermentescible, favorisent l'anaérobiose lorsque les conditions de celle-ci ne sont pas rigoureusement réalisées.

En possession des données précédentes, nous pouvons comprendre aisément ce qui se passe dans les cuves d'indigo.

Le vibron butyrique provient du son. On l'ensemence dans un liquide préalablement

tion de l'amidon de blé ou de pomme de terre (féculeries). Il agit en solubilisant les parois des cellules végétales.

chauffé à 90°-100°. Ce chauffage a deux effets favorables. D'abord il tue tous les germes non sporulés; parmi les spores qui résistent, la majorité appartient certainement au vibrion butyrique. Ensuite il chasse l'air en partie. Dans la cuve, le vibrion trouve abondamment les matières nécessaires à ses besoins; l'alcalinité, assez forte, ne le gêne pas et gêne au contraire les autres germes ayant résisté au chauffage ou ajoutés après celui-ci. Il est donc dans les meilleures conditions pour accomplir son rôle fermentatif et conséquemment réducteur. Si ces conditions ne sont pas réalisées, des « maladies » surviennent, qu'il est aisé d'expliquer, au moins d'une façon générale. La fermentation peut languir (sans que l'alcalinité soit en cause; c'est alors que l'ensemencement n'a pas été suffisant: on ajoutera du son (c'est-à-dire des vibrions); la fermentation peut s'exagérer: on la modère en forçant l'alcalinisation (addition de chaux), c'est-à-dire en tempérant le développement du ferment. La fermentation peut languir par excès d'alcali: on neutralise la chaux surabondante à l'aide du sulfate ferreux. Enfin, par insuffisance d'alcali, une véritable putréfaction peut survenir; c'est que la végétation du vibrion a été enrayée par celle de nombreux microbes putrides auxquels un milieu pauvre en chaux convient parfaitement: le remède consiste: 1° à tuer ces germes en chauffant à 90°; et 2° à empêcher le développement de ceux qui n'auraient pas été atteints par la chaleur (germes sporulés) ou qu'on ajouterait après coup, en rétablissant

le titre alcalin normal (addition de chaux).

Une bonne fermentation ne saurait donc s'obtenir qu'en réalisant et en maintenant avec soin l'ensemble des conditions favorables au vibrion butyrique et défavorables aux autres germes qui peuvent l'accompagner. En un mot, la réduction de l'indigo repose tout entière sur la physiologie du vibrion, ou mieux des vibrions, butyriques.

FIN.

TABLE

Généralités.....	5
------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

EMPLOI DES MATIÈRES COLORANTES DANS L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROBES

Généralités sur les microbes.....	7
Bactéries.....	7
Habitat des microbes.....	11
Examen des microbes sans coloration.....	12
Matières colorantes employées en bactériologie....	14
Forme sous laquelle on emploie les matières colo- rantes.....	16
Préparation des objets destinés à l'étude microsco- pique.....	21
Préparation des lames.....	21
Préparation des coupes.....	23
Exemples.....	24
Coloration des bactéries et des éléments anatomi- ques dans les préparations sur lames.....	26
Méthode directe.....	26
Méthodes indirectes.....	30
— de Gram.....	31
— d'Ehrlich.....	35
Coloration des bactéries (et des éléments anatomiques) dans les coupes.....	38
Méthode directe.....	38
— de Gram.....	39
— d'Ehrlich.....	40

Coloration des sporès.....	41
Coloration des cils.....	43
Coloration des capsules.....	45

DEUXIÈME PARTIE

LES MICROBES PRODUCTEURS DE MATIÈRES COLORANTES

Généralités.....	47
Bacille pyocyanique ou bacille du pus bleu.....	53
Bacilles fluorescents divers.....	58
Bacille cyanogène (bacille du lait bleu).....	59
Bacilles prodigiosus.....	60
Microbes lumineux.....	64

TROISIÈME PARTIE

ROLE DES MICRO-ORGANISMES DANS LA FORMATION ET L'APPLICATION DE COULEURS (COLORANTS NATURELS)

Généralités.....	66
Fermentation de l'indigo.....	68
— de l'oseille.....	70
Rôle des bactéries dans la teinture en indigo.....	71

FIN DE LA TABLE.

