

bles batonnets et une grandeur moyenne (1). Mais quelque divers que fussent les changements déterminés par l'inoculation d'eau, il n'en résulta pas, dans le cours de plusieurs expériences semblables, un seul exemple de fermentation lactique.

Nous voyons donc, par les faits que j'ai produits, que l'acidification du lait, au lieu d'être une propriété inhérente au liquide — comme on pourrait le supposer tout naturellement *a priori* en la voyant se produire constamment en tout lait venu d'une laiterie — est un changement qui, pour le lait bouilli ou non bouilli, réclame l'introduction de quelque chose du dehors, et que ce quelque chose est un article rare, dans l'air comme dans l'eau, sauf dans les laiteries. Au fait, même dans une laiterie, bien que cet article soit présent dans le lait de toutes les terrines, il n'en résulte pas nécessairement qu'il soit le ferment le plus abondant de l'air. Je portai un jour dans une laiterie un verre chargé de lait bouilli pur et, l'ayant posé près d'une terrine, je soulevai sa cloche et sa capsule de verre et je le laissai découvert durant un quart d'heure, croyant qu'il en résulterait probablement de la fermentation lactique. Mais il n'en fut pas ainsi. Par suite de cette exposition, un fungus fibrillaire fit son apparition, ainsi qu'une bactérie, mais une bactérie associée à une altération très extraordinaire, savoir un degré de viscosité extrême qui me rappela celle du liquide glutineux dont l'araignée perle sa toile. En introduisant la pointe d'une aiguille dans le liquide et en l'élevant ensuite dans l'air, j'en tirai un fil à peine visible qui ne se rompit qu'après avoir atteint un

(1) Ces expériences furent faites au commencement de 1873 et il en fut parlé brièvement dans le *Lancet* de cette année. (Voir p. 596).

mètre de longueur. Telle fut la fermentation spéciale qui résulta cette fois de l'exposition de lait à l'air d'une laiterie même; il arriva que, s'il y avait bien réellement des particules de ferment lactique flottantes dans l'air, du moins aucune d'elles ne tomba dans le verre.

C'est pourquoi la fermentation lactique, par l'évidence de ses effets et la rareté du ferment dans les circonstances ordinaires, me parut être particulièrement favorable aux investigations.

Maintenant, avant d'aller plus loin, je désire rectifier une erreur dans laquelle je tombai, il y a quelques années, en étudiant cette même fermentation; car ce que l'homme peut faire de mieux, à mon avis, après la divulgation d'une vérité nouvelle, c'est la rétractation d'une erreur publiée. En 1873, je publiai dans le *Microscopical Journal* un rapport sur la manière dont se comportait, à ce que je croyais, le *Bacterium lactis* en présence de différents liquides (1). J'y disais qu'ayant pris du lait aigri venu d'une laiterie, j'avais inoculé avec une petite goutte de ce lait un verre d'urine pure et non bouillie, et qu'il en était résulté dans ce dernier liquide le développement d'organismes très différents des bactéries que j'avais vues dans le lait aigri. Ces dernières avaient les caractères déjà décrits de *Bacterium lactis* (planche XX, fig. 9), c'est-à-dire qu'elles formaient des couples ou des chaînes de petits corps ovales, avec des lignes de segmentation transversale. Les organismes de l'urine, d'autre part, étaient larges et extrêmement longs, souvent enroulés comme les spirillum, mais immobiles comme *Bacterium lactis*. Il y avait toutefois des individus qui avaient certainement l'air d'être des formes

(1) Voir *Quarterly Journal of Microscopical Science*, oct. 1875.

transitoires entre les deux. De cette urine j'inoculai un autre verre du même liquide et il y eut reproduction du même organisme, grand et semblable au spirillum. Ensuite j'inoculai du second verre d'urine un verre chargé de liquide de Pasteur ; cette fois il y eut une apparition toute différente des précédentes : au lieu des chaînes immobiles de *Bacterium lactis* du lait ou du spirillum de l'urine, j'eus des petites bactéries doubles et automobiles. Mais en introduisant une petite goutte du liquide de Pasteur ainsi peuplé dans un troisième verre d'urine, je retrouvai de grands organismes spiroïdes semblables à ceux des premiers verres d'urine, sauf que les derniers offraient des mouvements languissants. Toutefois, l'introduction d'une petite goutte de ce troisième verre d'urine dans un verre de lait bouilli pur, fut suivie d'acidification et de coagulation tout comme si l'inoculation avait été faite avec du lait aigri venu d'une laiterie. Les formes apparemment transitoires du premier verre à urine me firent supposer que le spirillum était le *Bacterium lactis* modifié par un nouveau milieu. J'examinai aussi au microscope, dans un verre à culture, une goutte prise à un mélange d'urine fraîche avec une petite quantité du liquide de Pasteur contenant les bactéries mobiles, et je vis les petits organismes que j'avais aperçus d'abord faire place à des individus plus grands à motilité languissante, et je crus avoir vu ainsi le passage d'une forme à l'autre. Enfin le pouvoir d'agir comme ferment lactique exhibé par le contenu du troisième verre d'urine, malgré les diverses formes prises dans des milieux divers, me confirmèrent dans la croyance que je n'observais qu'un seul et même organisme dans tous les verres. Si tel était réellement le cas, et si nous considérons combien

l'organisme devait avoir été lavé par ces différents milieux de toute substance chimique qu'on aurait pu lui croire originalement associée dans le lait — particulièrement si nous considérons que la fermentation lactique n'apparaît ni dans l'urine ni dans la solution de Pasteur — cette chaîne de faits semblait confirmer puissamment l'opinion, que la bactérie en question était bien la cause de la fermentation lactique. Il y a quelques mois je citai ces faits à un physiologiste éminent, partisan de l'opinion que les bactéries pouvaient, après tout, n'être que les compagnes accidentelles des changements fermentiels ; et quand j'eus fini mon histoire, il me dit : « bien, je suis convaincu ». Je me dis alors : « si par ces faits j'ai pu convaincre cet éminent professeur, ces faits méritent une démonstration plus rigoureuse ; je pourrai disposer de quelque temps entre la clôture de mon cours de chirurgie à Edimbourg, et l'ouverture de mon cours à Londres, ce temps je le consacrerai à répéter mes expériences ; mais cette fois je veux faire au microscope des observations continues, et tracer sur le fait, si je le puis, le processus de transformation de l'organisme ». Conséquemment je me procurai à la même laiterie, du lait en train de s'aigrir, et de ce lait j'inoculai d'abord un verre d'urine incontaminée, non bouillie, puis un verre de pure solution de Pasteur. Pour l'urine le résultat fut que, au lieu d'obtenir un grand spirillum immobile comme dans l'expérience correspondante antérieure à celle-ci de quatre années, je trouvai une bactérie double, de taille modérée et automobile. D'autre part, dans la solution de Pasteur, au lieu de la petite bactérie très mobile de la première expérience, je n'obtins que des bactéries immobiles et de grandeur variable.

Ici donc nos faits n'étaient plus concordants. Quelle était l'explication? J'avais eu évidemment quelque contamination accidentelle de *Bacterium lactis* par d'autres organismes, bien que je n'eusse introduit pour les inoculations que la très petite quantité de liquide adhérente à la pointe d'une aiguille chauffée. Je me décidai ainsi à tenter de me défaire de bactéries concomitantes d'autres espèces, et la manière dont je crus pouvoir atteindre ce but, fut de diluer le lait en voie d'acidification avec de l'eau bouillie et conséquemment pure, en quantité assez grande pour n'avoir, en moyenne, approximativement, qu'une seule bactérie de n'importe quelle espèce dans chacune des gouttes qui devaient servir à l'inoculation d'une série de verres de lait bouilli. Si ce plan était réalisable, alors, comme le *Bacterium lactis* devait être présent en bien plus grande quantité qu'aucune autre espèce, je pouvais espérer que quelques-unes au moins des gouttes d'inoculation contiendraient cet organisme à l'exclusion de tout autre, et qu'ainsi je pourrais voir le *Bacterium lactis* se développer pur et sans mélange dans le lait inoculé. Je me procurai conséquemment à la laiterie du lait en train de s'aigrir et j'en inoculai un verre de lait bouilli, en trempant successivement dans les deux fluides la pointe d'une aiguille chauffée, et quand l'odeur de lait aigre fut perceptible sous la cloche protectrice, je trouvai des bactéries à l'examen microscopique et je me mis en devoir d'en estimer le nombre relativement à la quantité du milieu liquide.

C'est ce que je fis de la manière suivante. A l'aide de la seringue déjà décrite (page 513) je pouvais mesurer avec une précision parfaite les centièmes de goutte; or je trouvai que $\frac{1}{50}$ de goutte pouvait s'étaler exactement sur la

surface d'une mince lamelle couvre-objet de $\frac{1}{2}$ pouce de diamètre; de sorte que, lorsqu'une gouttelette semblable était déposée sur la plaque porte-objet et recouverte d'une lamelle circulaire à dimensions susdites et parfaitement plane, cette dernière n'admettait pas sous elle le moindre globule d'air, et que le filet liquide qui se formait tout le long de son bord était si étroit qu'il n'occupait pas, même sous le plus fort grossissement, un quart de diamètre du champ microscopique. En d'autres termes, $\frac{1}{50}$ de goutte était étalé en une couche mince et uniforme d'une étendue égale à celle de la lamelle couvre-objet. Donc le nombre des bactéries enfermées sous cette lamelle, c'est-à-dire dans $\frac{1}{50}$ de goutte, était égal au nombre des bactéries situées dans un champ microscopique, pris autant de fois que la surface de ce champ était comprise dans la surface de la lamelle. Le micromètre donnait en millièmes de pouce le diamètre du champ; et la lamelle couvre-objet avait un diamètre de 500 millièmes de pouces: or les surfaces des cercles étaient naturellement proportionnelles aux carrés de ces diamètres. Donc tout ce qu'il me fallait pour pouvoir calculer le nombre de bactéries comprises dans $\frac{1}{50}$ de goutte, c'était d'évaluer assez exactement le nombre des bactéries visibles dans un champ microscopique, ce que je fis en comptant les organismes dans un assez grand nombre de champs dont je pris la moyenne (1).

(1) Je trouvai grand avantage à placer la lamelle couvre-objet circulaire (chargée du liquide) sous une autre lamelle mince et assez grande pour recouvrir, en outre, une chambre creusée dans une épaisse plaque de verre. Une goutte d'eau suffit pour fixer les bords de cette mince lamelle à la plaque épaisse et pour prévenir l'évaporation du liquide à examiner dans la chambre à air, de sorte que la quantité de ce liquide demeura constante. En même temps, l'objet étant placé à la face infé-

Il arriva que je vis au microscope deux sortes de bactéries, l'une immobile, ayant les caractères de *Bacterium lactis*, l'autre en nombre beaucoup moindre, disposée en chaînes plus longues et en active motion. Règle générale, en examinant du lait en voie de fermentation lactique mais encore fluide, on n'y peut découvrir que le *Bacterium lactis*; mais cette fois nous eûmes la preuve oculaire de la présence d'une autre espèce quoique beaucoup moins abondante. Après avoir évalué le nombre des bactéries présentes dans 1/50 de goutte, je trouvai qu'il était nécessaire de diluer le lait avec non moins d'un million de parties d'eau bouillie, pour arriver à n'avoir en moyenne qu'une bactérie dans 1/100 de goutte (1). Cela fait, 1/100 de goutte de l'eau infectée fut introduit à l'aide de la petite seringue (2) (représentée page 513) à chaque membre d'une série de cinq verres

rieure de la lamelle mince, il fut possible d'employer une lentille à immersion pour l'examiner jusqu'à ses extrêmes limites, sans que la goutte d'eau où se baignait l'objectif vint se mêler au liquide à examiner, ce qui serait arrivé si j'avais placé l'objet à la face supérieure de la lamelle.

(1) Je fis aisément la dilution avec cette énorme quantité d'eau en divisant l'opération en deux temps. D'abord, à l'aide de la petite seringue (représentée page 513), dont le bout fut purifié, j'ajoutai 1/100 de goutte de lait à 200 gouttes d'eau bouillie, lesquelles avaient été introduites dans un verre purifié à l'aide d'une pipette graduée, pure, reliée à une seringue; l'extrémité de la pipette en rapport avec la seringue avait été bourrée d'ouate avant purification dans la boîte chaude, de manière à filtrer l'air qui passerait de la seringue dans la pipette. Quand la teinte uniformément opaline de l'eau y indiqua la diffusion parfaite du lait (j'avais favorisé le mélange en agitant vivement avec une baguette de verre pure), une goutte de cette première dilution fut transférée à l'aide d'une seringue-pipette pure et plus petite, dans un second verre purifié chargé de 50 gouttes d'eau bouillie. Il est à peine nécessaire d'ajouter que je mis tous mes soins pour n'exposer que momentanément à l'air les liquides manipulés, les pipettes purifiées et les autres objets employés.

(2) Le bout de cette seringue fut purifié par l'ébullition dans l'eau entre l'emploi mentionné dans la note ci-dessus et l'inoculation des verres de lait.

chargés de lait bouilli, pur. Comme résultat de cette inoculation, un seul des cinq verres fut altéré. Les contenus des quatre autres demeurèrent indéfiniment fluides et inaltérés, et l'examen microscopique, fait après un intervalle de treize jours, n'y décela de bactéries d'aucune sorte. Toutefois, dans le cours du troisième jour, le contenu du cinquième verre se trouva converti en une masse solide; à l'examen, il se montra fortement acide, et sous le microscope il présenta, parmi des masses granuleuses de caséine, d'innombrables bactéries marquées des caractères ordinaires de *Bacterium lactis*, et dont je dessinai des spécimens reproduits dans ce diagramme (Planche XX, fig. 9). Je n'y pus toutefois découvrir d'autres bactéries; nous nous étions débarrassés de l'espèce mobile que nous avions vue à côté de *Bacterium lactis* dans le lait non encore dilué, et nous pouvions croire *a fortiori* que d'autres espèces, présentes sans doute dans le lait original, mais en trop petit nombre pour être découvertes, avaient été évitées.

Ayant donc obtenu le *Bacterium lactis* pur et sans mélange, je me mis à rechercher expérimentalement comment il se comporterait dans d'autres milieux. J'en inoculai un verre d'urine incontaminée, non bouillie; et maintenant, au lieu de la bactérie mobile résultée d'une inoculation correspondante faite avec du lait aigre quelques jours auparavant, ou du grand organisme spiroïde provenu de mes expériences antérieures à celles-ci de quatre années, apparut une bactérie immobile, douée de caractères identiquement semblables à ceux du *Bacterium lactis* du verre de lait, comme le montre ce diagramme (Planche XX, fig. 10), fait d'après une esquisse prise deux jours après inoculation de l'urine. Si l'une des espèces aperçues dans les expériences

précédentes avait été présente, l'insignifiant et immobile *Bacterium lactis* aurait probablement échappé à notre attention. Dans le cours des premières vingt-quatre heures, le développement de cette bactérie ne s'était révélé que par l'apparition de stries blanches, délicates et verticales sur le verre, sans que le liquide en fut troublé. Le jour après, toutefois, l'urine était manifestement trouble, mais dans la suite la végétation fut excessivement lente et elle n'eût que très peu d'effet sur l'odeur et sur la réaction du liquide. L'organisme conserva néanmoins son pouvoir d'agir comme ferment lactique en présence du lait, même après un séjour de quatre jours dans l'urine; en effet, j'inoculai à cette époque huit verres de lait bouilli avec des gouttelettes de cette urine diluée au point de n'avoir plus, en moyenne, que trois bactéries par goutte, et tous les verres s'aigrirent et se coagulèrent endéans les trois jours (1).

Le jour même où j'observai ce dernier fait, alors donc que la bactérie était encore en pleine activité, j'introduisis une parcelle de caillot d'un de ces verres dans un verre de solution de Pasteur, afin de voir comment l'organisme se comporterait dans ce liquide. Pour cette expérience, je me servis de ce que j'ai appelé un « tube à séparation » : tube de verre fléchi sous un angle de 45° (Voir fig. 9), ayant une branche plus courte que l'autre; la branche courte est bourrée d'ouate humide (e) que l'on purifie en même temps que le tube par l'ébullition dans l'eau. L'appareil est transféré, après purification, dans un verre à liqueur pur, où il

(1) Même après dix-sept jours de séjour dans l'urine, l'organisme possédait encore son pouvoir de produire la fermentation lactique, bien que ce pouvoir fût devenu moins énergique et n'arrivât à amener la coagulation qu'un jour plus tard.

est arrangé de façon à ce que la longue branche (f) soit placée verticalement et maintenue dans cette position par une monture en fil d'argent (g), appliquée avant purification de l'appareil. Le liquide à l'étude est alors versé dans le verre jusqu'à un niveau plus élevé que l'orifice de la petite branche, mais considérablement moins élevé que l'ouverture de la grande branche. Le liquide se fraye lentement un chemin à travers l'ouate et s'élève dans la longue branche du tube, et c'est dans le liquide de cette branche que la matière d'inoculation est introduite.

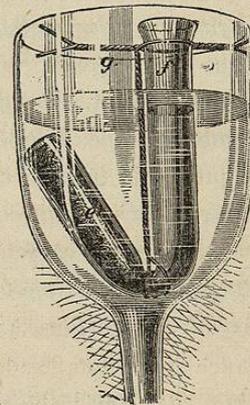


FIG. 9.

L'ouate de la petite branche est si fermement entassée qu'elle constitue un filtre efficace capable d'empêcher le passage de toute particule solide ordinaire; mais si un organisme capable de se développer dans le liquide en expérience est introduit dans la longue branche, cet organisme se frayera un chemin à travers l'ouate, et se montrera dans le liquide général du verre à liqueur. Même une bactérie immobile ou un champignon filamenteux sera capable de traverser la bourre compacte d'ouate avec une vitesse correspondante à la rapidité de son développement. Nous possédons ainsi un moyen simple de séparer des choses vivantes et capables de se développer dans un liquide spécial, de particules non vivantes ou incapables, quoique vivantes, de se développer dans ce milieu. C'est dans la longue branche d'un semblable tube séparateur, placé dans un verre de solution de Pasteur, que j'introduisis la parcelle de lait coagulé conte-

nant le *Bacterium lactis* en active végétation. Longtemps il parut que l'organisme ne se développait absolument pas dans son nouveau milieu. Mais environ trois semaines après, croyant remarquer que le petit fragment de caillot semblait un peu gonflé, je le soumis à l'examen microscopique, et je trouvai que la substance du caillot semblait avoir disparu, sa place étant occupée par de petites bactéries douées des caractères de *Bacterium lactis*, preuve que l'organisme s'était réellement développé. Mais il semblait n'avoir grandi que là où il pouvait se nourrir de la substance du caillot; car le liquide extérieur du verre ne montrait, ni à l'œil nu ni au microscope, aucune trace d'organisme. Il semble donc que le *Bacterium lactis*, quoiqu'il ne soit point détruit par la solution de Pasteur, ne trouve point dans ce liquide les matériaux nécessaires à sa nutrition. J'imitai également, dans un autre verre de solution de Pasteur, l'expérience de quatre ans auparavant, en inoculant ce liquide avec de l'urine ou le *Bacterium lactis* se développait activement, mais ici encore, bien que le spécimen fût conservé pendant vingt et un jours, il ne se montra aucun signe de développement bactérien. Il devint donc évident que *Bacterium lactis* est réellement incapable de croître dans la solution de Pasteur pure (1).

Je fus ainsi forcé de conclure que les formes organisées que j'avais décrites dans ma précédente communication comme des modifications du *Bacterium lactis*, étaient des

(1) Il est juste de dire que la solution dont je me servis s'éloignait de la formule de Pasteur, en ce qu'elle ne contenait que la demi-proportion de sucre et en ce que ses sels minéraux provenaient de cendres de bois et non de cendres de levure. C'était toutefois avec une solution de composition exactement semblable que j'avais fait l'expérience antérieure de quatre années.

apparences décevantes dues à la présence accidentelle d'autres espèces. Maintenant que nous savons, par l'expérience des petites éprouvettes, combien sont nombreux les bactéries et les autres organismes qui infectent réellement le lait, il est facile de comprendre comment une telle confusion peut s'être produite (1).

Alors, toutefois, comme j'avais de bonnes raisons pour croire que je possédais le *Bacterium lactis* pur et sans mélange, je procédai à l'exécution de l'expérience qui constitue la partie la plus importante de ces recherches. J'ai

(1) En réalité, il n'est pas très facile de bien préciser quelle fut la marche des événements dans les expériences d'il y a quatre années. Je puis proposer la suivante comme possible. D'abord, avec le *Bacterium lactis* dont la première urine fut inoculée (voir page 517), il y eut introduction accidentelle d'une autre espèce bactérienne qui produisit les grands organismes spiroïdes. L'organisme adventice grandit librement dans l'urine, à côté du *Bacterium lactis* à croissance lente et peu remarquable. Il variait considérablement de forme et certaines de ses variétés ressemblaient étroitement aux chaînes de *Bacterium lactis*, mais il constituait en réalité une espèce complètement distincte. Plus tard, quand la solution de Pasteur fut inoculée de l'urine, les deux organismes y furent encore introduits ensemble. Ici l'organisme spiroïde se modifia et prit les caractères d'une bactérie double, auto-motile, transition qui fut, je pense, suffisamment suivie au microscope (voir *Microscopical Journal*, loc. cit.). Pendant ce temps le *Bacterium lactis* restait dormant dans ce milieu tout en y conservant sa vitalité, et il arriva par hasard qu'un ou plusieurs individus restés vivants, qui se trouvaient peut-être à la surface du liquide, dans la tache d'écume qui résulte communément de l'inoculation, furent transférés avec l'autre organisme dans le dernier verre d'urine. Ici ce dernier organisme reprit la forme spiroïde qu'il avait eue autrefois dans l'urine, tout en conservant quelque temps, à un degré limité, le mouvement qu'il avait acquis dans la solution de Pasteur. Le représentant ou les représentants de *Bacterium lactis* introduits avec lui dans l'urine, purent s'y développer à nouveau, quoique avec lenteur, quelques individus de leur progéniture arrivèrent dans le verre de lait bouilli inoculé du verre d'urine et se développèrent dans ce milieu avec leur rapidité habituelle et l'effet fermentatif ordinaire. Cette exposition hypothétique et compliquée paraîtra peut-être oiseuse, mais je me laisse entraîner à l'émettre pour montrer les soins excessifs qui sont indispensables pour éviter les déceptions, lorsqu'on a affaire à des organismes si extrêmement petits.