

décrivit déjà le mode de procéder en parlant des moyens employés pour isoler *Bacterium lactis*. Cette fois l'objet de l'expérience était d'obtenir, si possible, une preuve absolue, capable de s'imposer au jugement de tous, que le *Bacterium lactis* est réellement la cause de la fermentation lactique, et non simplement le compagnon accidentel de cette transformation.

Le 30 août dernier, je me procurai seize verres purs, chargés de lait bouilli; je calculai ensuite, à la façon déjà décrite, le nombre des bactéries présentes dans chaque 1/50 goutte d'un verre de lait bouilli que j'avais inoculé la veille en touchant son contenu avec la pointe d'une aiguille chauffée, trempée dans du lait coagulé sous l'influence du ferment pur; je diluai une goutte de ce lait, au degré requis avec de l'eau bouillie, puis dix de mes seize verres incontaminés reçurent chacun une gouttelette censée contenir, chiffre moyen, une seule bactérie, tandis que cinq autres reçurent des gouttes censées contenir chacune deux bactéries et que le dernier verre reçut un volume qui pouvait, d'après mon estimation, contenir quatre bactéries. Le résultat fut que, en dedans les trois jours et demi, le verre dans lequel quatre bactéries avaient été censément introduites, se trouva contenir une masse coagulée, et que les cinq verres qui avaient reçu des gouttes à deux bactéries, avaient subi le même changement. A cette époque la majorité des dix verres inoculés avec des gouttes qui pouvaient contenir en moyenne une bactérie, étaient encore fluides; mais quelques-uns d'entre eux subirent la solidification dans le cours des vingt-quatre heures suivantes, bien qu'à des époques différentes. En somme, il arriva que de cette série de dix verres, cinq exactement restèrent indéfiniment liquides.

Tel était exactement le résultat que nous aurions pu prévoir, si nous avions admis que les bactéries sont réellement la cause de la transformation fermenticielle et supposé que nous eussions convenablement estimé leur nombre. Il fallait nous attendre alors à une répartition non complètement uniforme des bactéries dans l'eau avec laquelle le lait avait été dilué, nous attendre, dis-je, à ce que par là, probablement, quelques-unes des gouttes censément munies d'une bactérie en moyenne, seraient exemptes d'organismes, tandis que d'autres en auraient plus d'un, et des nombres variables, impliquant de légères différences dans leur ordre d'arrivée à cette époque du processus fermenticiel qui détermine la coagulation.

Mais les résultats de cette expérience ne concordaient pas seulement avec l'opinion que *Bacterium lactis* est réellement l'agent fermentatif, elles pouvaient, d'après ma conviction, fournir la preuve incontestable de la véracité de cette théorie, pourvu qu'il fût constaté, et ma précédente expérience me le garantissait sûrement, que chaque verre coagulé contenait la bactérie et que chaque verre resté fluide ne la renfermait point. Bien que je n'eusse point de doute à cet égard, comme je l'ai déjà dit, j'accomplis néanmoins jusqu'au bout la laborieuse tâche d'examiner le contenu de toute la série des seize verres; je le fis juste avant de quitter Edimbourg, neuf jours après l'inoculation. Tous les verres coagulés renfermaient encore un caillot blanc, inaltéré, à surface brillante, et rien n'y pouvait indiquer un changement secondaire à celui de la fermentation lactique. L'air renfermé sous la cloche de chacun d'entre eux avait l'odeur aigre; le goût d'une petite portion de caillot enlevée pour l'examen était aigre et sa réaction vivement acide, et chaque

parcelle montra au microscope des bactéries marquées des caractères de *Bacterium lactis*, sans aucun autre organisme. Quant aux cinq autres verres où le lait restait encore fluide et inaltéré d'aspect, ils avaient tout simplement communiqué à l'air de leurs cloches la légère odeur de suif que Pasteur a signalée depuis longtemps comme un résultat d'oxydation; leur goût était celui de lait frais, et leur réaction essayée montra cette forme particulière de neutralité qu'a le lait frais de communiquer au papier de tournesol bleu ou rouge une teinte pourpre intermédiaire (1). J'examinai au microscope le contenu de chaque verre, et, dans le cours de longues recherches, je n'y pus découvrir d'organismes d'aucune sorte. J'ai apporté à la Société un de ces derniers verres (toujours protégé par sa capsule et sa cloche) pour vous montrer que, même après un laps de près de quatre mois, ce lait est fluide et inaltéré. Je n'ai guère besoin de vous dire qu'il a fallu beaucoup de vigilance pour transporter ces verres ici d'Edimbourg sans renverser leur contenu. Quoi qu'il en soit, en voici un qui a fait le voyage avec succès; et j'ai placé sous un des microscopes une goutte de son lait, où l'on pourra voir qu'il n'y a point d'organismes, et que la seule altération perceptible consiste dans la forme anguleuse qu'ont prise certains globules comme résultat d'évaporation.

Voici un des verres qui subirent la fermentation lactique, et son aspect est vraiment aussi remarquable que celui du précédent. Nous savons que si l'on conserve du lait coagulé dans les circonstances ordinaires, ce lait perd bientôt ses caractères originaux. L'*Oidium lactis* croît à sa surface, le *Penicillium glaucum* ou quelque autre moisissure com-

(1) L'urine neutre a la même réaction.

mune s'y montre ordinairement, et le caillot acquiert d'abord une odeur de fromage, puis une odeur putride, en même temps que se manifestent de grandes altérations d'aspect. Ici, au contraire, la fermentation lactique s'étant seule produite, nous avons un pur caillot blanc, comme si la coagulation ne s'était produite que d'hier, et une odeur un peu aigrelette est tout ce que l'on perçoit sous la cloche (1).

(1) Je fais bien, je pense, d'ajouter quelques détails importants, à l'usage de ceux qui désireraient répéter cette expérience. L'estimation du nombre de bactéries présentes dans le lait doit se faire environ vingt-quatre heures après l'inoculation du verre; l'inoculation doit avoir été faite avec la pointe d'une aiguille purifiée, trempée dans du lait en voie d'acidification sous l'influence du ferment pur, puis appliquée au lait à inoculer tout contre la paroi du verre, champ que nous distinguons de la partie centrale où l'on prendra plus tard la goutte de calcul. Par une température ordinaire, on trouvera alors, vers l'époque susdite, les bactéries de pleine grandeur, isolées et pour cela faciles à compter; tandis que si l'on attendait trop longtemps après l'inoculation, elles seraient trop nombreuses pour être comptées avec facilité, et souvent aussi de petite taille et réunies en groupes indéfiniment nombreux. Ensuite, si après avoir compté les bactéries d'une première goutte, on prend une autre goutte pour la dilution et l'inoculation finale, deux grands inconvénients en résulteront. D'abord on n'aura pas la certitude que les deux gouttes contenaient la même proportion de bactéries; en second lieu, la notion de la multiplication rapide des bactéries (dont le nombre est doublé en une heure environ) poussera à une précipitation regrettable dans l'examen microscopique et le calcul subséquent, outre qu'elle laissera de l'incertitude quant à l'exactitude de l'appréciation, à cause de la multiplication qui se poursuit dans le verre de lait. Mais on surmonte entièrement ces difficultés en ajoutant, dans un verre purifié, une goutte du lait d'inoculation à dix gouttes d'eau bouillie et en empruntant à cette première dilution une goutte pour faire l'estimation du nombre de bactéries et une goutte à diluer ultérieurement pour l'inoculation. Le lait ayant été bien mêlé à l'eau, les bactéries sont assez également distribuées dans le véhicule, tandis que l'addition d'une telle quantité d'eau retarde fort le développement de ces organismes et dispense ainsi de toute précipitation. Ainsi, je m'assurai un jour que le taux de croissance des bactéries dans une telle dilution de lait conservée et abritée dans un verre pur, ne se chiffrait que par le triple du nombre des bactéries en seize heures, tandis que ce nombre aurait probablement été quadruplé en deux heures si le lait n'avait pas été dilué. La dilution présente, en outre,

Et maintenant laissez-moi vous entretenir quelques minutes de la conclusion à tirer de ces faits. Nous avons vu que de l'eau bouillie, infectée par l'addition d'une petite quantité de lait en voie de fermentation lactique, ayant été introduite par gouttelettes d'égal volume dans dix verres de lait bouilli pur, cinq de ces verres subirent la fermentation lactique caractérisée par l'acidification et la coagulation, tandis que les cinq autres restèrent complètement inaltérés. Cela prouve que la même vérité que nous avons établie pour les ferments divers qui se rencontrent dans l'eau ordinaire, s'applique également au ferment lactique, c'est-à-dire que ce ferment n'est pas une matière soluble dans l'eau, mais consiste en particules insolubles. Car si le ferment avait été dissous dans l'eau d'inoculation, chaque goutte de même volume inoculée aurait produit le même effet fermenticel. Nous avons ensuite à considérer quelle est la portée de nos faits sur la nature de ces particules insolubles, la question étant de savoir si ces particules étaient les bactéries ou si elles consistaient en un soi-disant ferment chimique privé de vie, dont les bactéries n'auraient été que les compagnes accidentelles. Admettons, par hypothèse, qu'il puisse y avoir des particules chimiques à la fois privées de vie et capables de multiplication comme les bactéries. Une telle notion n'est soutenue, je pense, par aucune preuve scientifique; mais, pour faciliter le raisonnement, admettons pour un instant qu'il en soit ainsi. Nous serions

l'avantage d'enlever entièrement la difficulté que l'on éprouve à distinguer les bactéries parmi les globules et molécules du lait quand il n'est pas dilué, fût-il même étalé en couche très mince. En comptant les bactéries, je trouvai commode de prendre successivement tous les champs suivant le diamètre horizontal et suivant le diamètre vertical de la lamelle couvre-objet, ce qui, sous mon microscope, donnait environ une centaine de champs dont j'eus à calculer la moyenne.

ensuite obligés de supposer, pour rendre compte de nos faits, que ces particules hypothétiques, bien que n'accompagnant qu'accidentellement les bactéries, se trouvaient présentes en nombre précisément égal, ce qui est une chose entièrement inconcevable. Mais nous devrions aller plus loin et supposer, ce qui est tout aussi inconcevable, que ces corps de nature différente, bien qu'accidentellement réunis, n'étaient pas seulement également nombreux, mais s'accompagnaient invariablement l'un l'autre par couples; de sorte que, lorsqu'une bactérie était introduite dans un des verres, elle était toujours accompagnée d'une particule du vrai ferment hypothétique, et que partout où la bactérie était exclue, il en était de même pour le ferment hypothétique. Ainsi donc, comme la seule autre interprétation possible de nos faits entraîne des hypothèses entièrement inconcevables, je me permets de penser que tous verront dans ces faits la démonstration concluante de cette vérité, que l'espèce bactérienne particulière que nous venons d'étudier est réellement la cause de cette fermentation spéciale (1).

Il est vrai que cette démonstration ne s'applique qu'à une

(1) Pour parler rigoureusement, il faudrait dire, non « la cause », mais « la cause dans les circonstances ordinaires ». Car nos faits, naturellement, n'excluent pas la possibilité de l'existence de quelque autre ferment qui pourrait produire le même effet sur le lait, si les circonstances étaient favorables à son développement, si, par exemple, *Bacterium lactis* était exclu. En vérité, j'obtins un jour dans du lait traité directement dans un verre purifié, une petite bactérie mobile qui, bien qu'elle se développât avec une grande lenteur comparativement à *Bacterium lactis*, produisit au bout d'un certain temps un caillot acide dû, je n'en ai guère de doutes, au changement du sucre de lait en acide lactique. Mais, compris comme nous venons de le dire, les termes du texte peuvent être considérés comme admissibles; c'est ainsi que nous désignons le champignon de la levûre comme la cause de la fermentation alcoolique, bien que nous sachions que le *Mucor racemosus*, lorsqu'il se développe sans mélange dans une solution sucrée, donne lieu au même changement fermenticel.

fermentation particulière. Mais la même méthode pourra, je pense, être appliquée dans d'autres occasions et servir à déterminer le degré d'universalité de cette règle : que toute fermentation vraie, c'est-à-dire toute fermentation dont le ferment est capable de se reproduire, est causée par le développement d'un organisme. En attendant, comme elle constitue une contribution d'un caractère précis dans toute sa portée, à la détermination de la nature des changements fermentiels, champ si plein d'intérêt actuellement pour le médecin comme pour le chirurgien, j'ai l'espoir de la voir bien accueillie par la « Pathological Society ».

Dans le cours de cette investigation, je rencontrai quelques autres points dont je voudrais vous parler. L'un d'eux se rapporte à la cause de l'odeur du lait aigre. Dans la fermentation lactique, le sucre de lait se décompose en acide lactique simplement par un nouvel arrangement de ses atomes constitutifs ; un atome de sucre de lait sert à former quatre atomes d'acide lactique, sans gain ni perte. Or, les chimistes nous disent que l'acide lactique n'est point volatile, et effectivement cet acide, en l'état de pureté, est absolument inodore. Mais alors, pourquoi le lait qui s'aigrit a-t-il de l'odeur ? En réalité, ces recherches ont prouvé, par l'isolement du vrai ferment lactique, que l'odeur du lait qui s'aigrit est due principalement aux produits d'une ou plusieurs autres fermentations concomitantes.

En effet, quand un verre de lait pur s'acidifie sous l'influence de *Bacterium lactis* pur et sans mélange, l'odeur qui en résulte est extrêmement insignifiante. Néanmoins l'air enfermé sous la cloche qui recouvre un verre de lait placé dans ces circonstances, a une odeur légèrement piquante ; et il ne m'a pas semblé inutile de laisser fermenter ainsi

une quantité considérable de lait pour la distiller ensuite, et m'assurer, si possible, de la nature de la substance odorante. Ayant fait coaguler du lait bouilli, dans une bouteille purifiée, sous l'influence de pur *Bacterium lactis*, je mêlai six onces du caillot récent avec cinq onces d'eau distillée et j'introduisis le mélange dans une cornue que je chauffai durant quelques heures dans un bain d'eau bouillante ; les produits distillés se réunissaient dans un récipient réfrigéré par des linges qu'arrosait un courant constant d'eau froide. Le produit qui, au bout de ce temps, s'était élevé à 5 1/2 drachmes de liquide aqueux clair, avait l'odeur acide du caillot, mais à un degré plus concentré. J'avais recueilli ce produit en trois portions successives dont la dernière avait relativement peu d'odeur aigre et plutôt le bouquet du pain. La portion sortie la première avait une odeur si aigre et si pénétrante que je ne doutais point qu'elle ne fût acide. A ma grande surprise toutefois, je la trouvai non-seulement insipide mais neutre au papier réactif. Je redistillai le produit et j'arrêtai l'opération après volatilisation de sa moitié ; le nouveau produit avait une odeur plus piquante encore que le premier, tandis que le résidu était presque inodore. Mais à une troisième distillation j'eus un produit moins piquant que le second, en conséquence, je suppose, de la perte d'une partie de l'ingrédient, par suite de son extrême volatilité. Je conservai le dernier produit pendant deux jours dans une bouteille fermée, et au bout de ce temps il avait encore son odeur spéciale. Il reste à déterminer quelle est la nature de cette substance. Il semble assez probable que ce puisse être quelque produit éthéré, doué de la propriété remarquable de posséder une odeur acide, quoiqu'étant insipide et neutre de réaction.

Pasteur s'est assuré que la fermentation alcoolique qui, comme nous le savons tous, consiste essentiellement dans la décomposition du sucre en alcool et acide carbonique, sans perte ni gain d'atomes, est accompagnée de l'apparition de petites quantités d'autres produits tels que la glycérine et l'acide succinique, et il est possible que la substance étherée du lait qui s'aigrit soit reliée d'une manière semblable à la fermentation lactique. Je regarde comme probable que ces produits apparemment secondaires, peuvent en réalité être d'une importance primaire dans la production des changements fermenticels. Pasteur a montré que si l'on ajoute de la levûre à une solution de sucre convenablement composée pour la nutrition de *Torula cerevisæ*, et que l'on expose le liquide à l'air, en couche mince, dans un vase plat, la torule s'y développe avec une rapidité particulière, mais qu'il en résulte peu de fermentation alcoolique; et que, au contraire, lorsqu'on place le liquide en quantité considérable dans un vase profond, la torule se développe avec une lenteur comparative mais donne lieu à une fermentation abondante. Il explique ce résultat remarquable en supposant que le champignon a besoin d'oxygène pour sa nutrition, que, lorsqu'il ne peut le trouver ailleurs, il l'enlève au sucre et occasionne ainsi la fermentation; mais que, lorsqu'il peut facilement emprunter à l'air l'oxygène nécessaire comme le permet un vase plat, il prospère particulièrement bien et que, n'ayant pas à prendre l'oxygène du sucre, il laisse ce dernier en repos, sauf qu'il en assimile des quantités relativement petites pour sa propre croissance (1).

(1) M. Pasteur exprima cette opinion en 1861 dans un *Bulletin de la Société chimique* où, après avoir relaté les faits dont il est parlé dans

Le fait offre certainement un extrême intérêt, parce qu'il semble prouver que la décomposition du sucre n'est pas due à la simple présence de l'organisme qui croît dans son voisinage; sinon la fermentation serait proportionnelle à la croissance de la torule et conséquemment bien plus abondante dans un vase superficiel. Mais l'explication de la différence des résultats, basée sur la nécessité ou la non nécessité qu'il y aurait pour la torule de prendre de l'oxygène au sucre, ne paraît pas applicable ici sans quelque addition à l'hypothèse première. Car le sucre ne perd point d'oxygène par sa conversion en alcool et acide carbonique et c'est pourquoi le retrait de cet élément serait incompatible avec le nouvel arrangement des atomes d'une molécule de sucre.

D'autre part, si nous comparons les formules de la gly-

le texte, il s'exprime ainsi : — « Il paraît dès lors naturel d'admettre que, lorsque la levûre est ferment, agissant à l'abri de l'air, elle prend de l'oxygène au sucre et que c'est là l'origine de son caractère de ferment. » Dans son récent ouvrage : *Etudes sur la bière*, 1876. M. Pasteur cite ces premières expressions de sa théorie et ajoute « elles n'ont rien perdu de leur rigueur; bien au contraire, le temps les a consacrées » (*op. cit.*, p. 237.) En exprimant son opinion présente, il emploie à la vérité des termes qui pourraient paraître susceptibles d'une interprétation différente, il dit par exemple : « La fermentation par la levûre s'est présentée à nous comme la conséquence directe d'un travail de nutrition, d'assimilation, de vie en un mot, effectué sans gaz oxygène libre. La chaleur consommée par ce travail a du être nécessairement empruntée de la matière fermentescible, c'est-à-dire au corps sucré, qui, à la manière des corps explosifs, dégage de la chaleur par sa décomposition. » La dernière phrase pourrait sembler ne pas se rapporter nécessairement à la question de la prise d'oxygène au sucre par la plante; mais elle est immédiatement suivie de celle-ci : « La fermentation par la levûre semble donc liée essentiellement à la propriété que possède cette petite plante cellulaire de respirer, en quelque sorte, avec l'oxygène combiné au sucre. » La théorie originale est ici pleinement rétablie, et nous sommes amenés à conclure que la décomposition du sucre, dont il est dit dans la phrase précédente qu'elle fournit la chaleur nécessaire pour le travail de nutrition, résulte de sa désoxydation.

cérine et de l'acide succinique à celle du sucre, nous voyons que le retrait d'un atome d'oxygène à chaque membre d'une série d'atomes de glycose, pourrait conduire naturellement à la formation simultanée des atomes moins complexes des autres substances avec les éléments restants du sucre, la formation de l'acide succinique entraînant la mise en liberté d'une certaine quantité d'hydrogène, lequel à son tour est requis pour la production de glycérine; nous voyons, en outre, que les proportions de poids dans lesquelles apparaîtraient les composés nouveaux, seraient celles suivant lesquelles Pasteur a effectivement trouvé qu'ils se présentent dans la fermentation alcoolique (1).

Ainsi la formation de glycérine et d'acide succinique paraît s'expliquer exactement par la théorie de Pasteur, c'est-à-dire par l'action désoxydante de la torule sur le sucre. Mais pour rendre compte en même temps de la décomposition d'un nombre beaucoup plus considérable d'autres particules de sucre en alcool et en acide carbonique, il semblerait nécessaire d'admettre en outre, que la décomposition de certains atomes de glycose en glycérine et en acide succinique, exerce une influence troublante sur

(1) D'après les « elements of Chemistry » de Miller, les formules des trois substances sont : Glycose (sucre de raisin), $C_6 H_{12} O_6$; Glycérine, $C_3 H_8 O_3$; Acide succinique, $C_4 H_6 O_4$. Donc, 5 atomes de glucose, moins 5 atomes d'oxygène, sont égaux à 10 atomes de glycérine, moins 10 atomes d'hydrogène; et 2 atomes de glucose, moins 2 atomes d'oxygène, valent 5 atomes d'acide succinique, plus 10 atomes d'hydrogène. Donc 7 atomes de glucose, moins 7 atomes d'oxygène, laissent les éléments nécessaires pour la production de 10 atomes de glycérine et de 5 atomes d'acide succinique. Or, le poids atomique de la glycérine, multiplié par 10, est 1860, et le poids atomique de l'acide succinique, multiplié par 5, est 534, de sorte que le poids de glycérine formé, vaudrait 5 à 6 fois le poids d'acide succinique; et c'est là à peu près exactement la proportion des deux substances que Pasteur a obtenue de sucre fermenté. (Voir « Miller's Chemistry », vol. III, p. 161.)

les particules voisines et pousse à leur réduction en composés plus simples sans perte d'atomes. Semblable théorie de la fermentation alcoolique du sucre serait une combinaison des idées de Pasteur et de celles de Liebig, et tout en assignant, avec la première de ces autorités, la place essentielle et primaire à l'organisme en végétation, admettrait avec la seconde une influence catalytique exercée par des substances organiques en voie de décomposition sur des composés instables voisins. Si tel est le véritable état de la question, on verra que la glycérine et l'acide succinique, loin d'être des produits secondaires et sans importance, sont en réalité, et bien qu'ils soient formés en quantité relativement minime, le premier effet de l'action de la torula sur le sucre, ce dont la production d'alcool et d'acide carbonique est un résultat secondaire quoique simultané. Ce sont des considérations de cette nature qui me semblent ajouter un intérêt spécial à la production du produit éthéré, odoriférant, que nous avons cité plus haut, comme accompagnant la fermentation lactique pure.

Cette théorie de la fermentation alcoolique présente l'avantage que le principe en est applicable, non seulement aux cas dans lesquels les organismes intéressés prospèrent, comme *Torula Cerevisiæ*, en présence d'oxygène libre, et que l'on peut conséquemment croire tout disposés à enlever cet élément aux matières fermentescibles quand ils ne peuvent le trouver à l'état libre (1), mais encore à des fermentations dans le genre de la fermentation butyrique où, comme Pasteur l'a démontré lui-même, la bactérie longue et mobile

(1) Un autre exemple bien connu est fourni par la moisissure commune, *Mucor racemosus*, qui, lorsqu'elle grandit à la surface d'une solution sucrée, détermine peu ou point de fermentation alcoolique,