

ANNALES SCIENTIFIQUES DE L'É.N.S.

C. CHAMBERLAND

**Recherches sur l'origine et le développement des
organismes microscopiques**

Annales scientifiques de l'É.N.S. 2^e série, tome 7 (1878), p. 3-94 (supplément)

http://www.numdam.org/item?id=ASENS_1878_2_7__S3_0

© Gauthier-Villars (Éditions scientifiques et médicales Elsevier), 1878, tous droits réservés.

L'accès aux archives de la revue « Annales scientifiques de l'É.N.S. » (<http://www.elsevier.com/locate/ansens>) implique l'accord avec les conditions générales d'utilisation (<http://www.numdam.org/conditions>). Toute utilisation commerciale ou impression systématique est constitutive d'une infraction pénale. Toute copie ou impression de ce fichier doit contenir la présente mention de copyright.

NUMDAM

Article numérisé dans le cadre du programme
Numérisation de documents anciens mathématiques
<http://www.numdam.org/>

RECHERCHES
SUR L'ORIGINE ET LE DÉVELOPPEMENT
DES
ORGANISMES MICROSCOPIQUES,

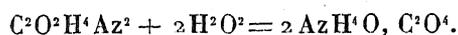
PAR M. CH. CHAMBERLAND.

On sait que les substances organiques, animales ou végétales, une fois soustraites à l'influence de la vie, éprouvent, lorsqu'on les abandonne dans l'air à une température convenable, des altérations ou décompositions qui sont dues à la présence et au développement d'organismes microscopiques, parmi lesquels se trouvent les ferments.

Ainsi, par exemple, de l'urine est abandonnée au contact de l'air à la température de 20 ou 25 degrés : le liquide préalablement acide ne tarde pas à devenir alcalin ; il se trouble, et l'on constate la présence d'organismes microscopiques : bactéries, torulas, moisissures, etc. Parmi ces organismes, il y en a un qui ne fait jamais défaut lorsque le liquide devient franchement alcalin ; il a été signalé pour la première fois par M. Pasteur, et étudié d'une façon toute particulière par M. Van Tieghem, dans un remarquable travail présenté, en 1864, à la Faculté des Sciences de Paris, pour obtenir le grade de docteur. Cet organisme est constitué par un grand nombre de points généralement associés deux à deux, et sa présence est accusée dans le liquide par des traînées blanches qui se déposent sur les parois du vase. Si on le sème dans de l'urine acide rendue stérile par l'action de la chaleur, il se développe,

S. r.

et l'urine devient alcaline. Cet organisme particulier a donc la propriété de transformer l'urée contenue dans l'urine en carbonate d'ammoniaque, en fixant sur l'urée 4 équivalents d'eau :



Il a reçu le nom de *ferment ammoniacal de l'urée*.

De même, si l'on écrase des raisins, le jus qui en résulte, et qui est d'abord très-sucré, perd bientôt sa saveur et devient alcoolique; en même temps, il se dégage de toute la masse une quantité de bulles d'acide carbonique, et au microscope on voit de nombreuses cellules pouvant affecter des formes un peu variables. Toutes les fois qu'un liquide sucré éprouve la fermentation alcoolique, on retrouve ces cellules; si on les sème dans un jus sucré conservé par l'ébullition, la fermentation se produit. Ces cellules, qui jouissent de la propriété spéciale de décomposer le sucre, en donnant principalement de l'alcool et de l'acide carbonique, portent le nom de *ferment alcoolique*.

Toutes les autres substances organiques se décomposent de même sous l'influence d'organismes microscopiques plus ou moins bien connus.

Mais d'où viennent ces organismes? Naissent-ils spontanément ou dérivent-ils de parents semblables à eux?

L'historique de cette question a été fait par M. Pasteur dans un travail publié en 1862, dans les *Annales de Chimie et de Physique*, et intitulé : *Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère, examen de la doctrine des générations spontanées*. Je n'y reviendrai donc pas. Il me suffira de dire que cette dernière doctrine était généralement abandonnée lorsqu'en 1871, à la suite d'une réponse de M. Pasteur à Liebig, devant l'Académie des Sciences, M. Frey raviva la question.

Dans la théorie de M. Pasteur, les organismes microscopiques dérivent tous de parents semblables à eux; ils viennent de l'extérieur, où ils existent sous une forme qui diffère souvent de celle que nous leur connaissons lorsqu'ils se développent dans les substances organiques, forme sous laquelle on les appelle des *germes*. Comme ces germes sont très-petits, ils doivent se retrouver dans les poussières que l'air tient en suspension, absolument de la même manière que les

spores des moisissures : de là le nom de *panspermie atmosphérique* donné quelquefois à cette théorie (¹).

Dans la théorie de M. Fremy, au contraire, « les poussières de l'air n'interviennent pas dans la génération des ferments; les milieux organiques sont doués d'une force végétative qui leur permet, au contact de l'air et par l'action de l'oxygène, de créer des ferments sans l'intervention des germes atmosphériques » (p. 8 de la brochure citée plus loin). En un mot, les ferments naissent spontanément, par le simple contact des substances organiques avec l'oxygène de l'air. Cette théorie a reçu de son auteur le nom d'*hémiorganisme*, et les substances qui engendrent les ferments le nom de *corps hémiorganisés*, pour « rappeler que ces corps ont souvent une organisation incomplète » (p. 6).

On voit que ces deux théories sont tout à fait opposées, et, comme les conséquences à en tirer, surtout au point de vue des maladies produites par la présence et le développement d'organismes microscopiques, sont de la plus haute importance, on comprend que la discussion ait passionné le monde savant. Cette discussion eut lieu devant l'Académie des Sciences, dans le courant de l'année 1871-1872. Les arguments en faveur de chacune des théories furent longuement développés par leurs auteurs, et l'on aurait pu croire le débat terminé lorsque, au commencement de l'année 1876, M. Fremy fit paraître un Ouvrage intitulé : *Sur la génération des ferments*, dans lequel, après avoir résumé la discussion qui eut lieu devant l'Académie, l'auteur, loin de se montrer convaincu par les arguments de M. Pasteur, maintient sa théorie et accentue son désaccord, par exemple, en ces termes :

« Je crois être en mesure de démontrer que la théorie de M. Pasteur n'est pas admissible; en faisant dépendre la production des ferments des poussières qui sont en suspension dans l'air, et en refusant aux milieux organiques la faculté d'engendrer des ferments, M. Pasteur est conduit à des impossibilités évidentes et se trouve en opposition avec des faits incontestables » (p. 7).

Bien que la théorie de l'hémiorganisme compte peu de partisans

(¹) Il est bon de faire remarquer toutefois que cette expression n'a jamais été employée par M. Pasteur.

aujourd'hui, j'ai pensé que je pourrais être utile aux autres et à moi-même en appliquant aux doutes que soulève à chaque pas le travail de ce savant Membre de l'Académie des Sciences les méthodes employées dans le laboratoire de M. Pasteur, où je travaille depuis trois ans.

J'ai été conduit d'ailleurs à faire beaucoup d'expériences nouvelles, et que je crois originales, au sujet des questions que soulèvent le développement de certains organismes microscopiques et leur résistance à l'action de la chaleur.

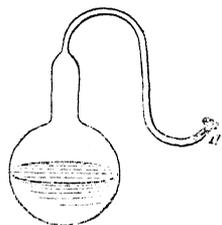
Conservation des liquides organiques soumis à l'ébullition.

Dès le début de ses travaux sur les fermentations, M. Pasteur chercha à réaliser les conditions nécessaires et suffisantes pour conserver des liquides organiques au contact de l'air. Pour cela il fallait : 1° tuer les germes pouvant exister dans le liquide; 2° mettre ce liquide en présence d'un air pur, c'est-à-dire ne contenant lui-même pas de germes de ferments.

Il réalisa ces deux conditions en faisant bouillir le liquide dans un ballon communiquant avec un tube de platine chauffé au rouge, puis laissant refroidir. L'ébullition avait tué les germes contenus dans le ballon, et l'air qui rentrait pendant le refroidissement était lui-même exempt de germes, ceux-ci ayant été brûlés pendant leur passage dans le tube de platine chauffé. Aussi, dans ces conditions, les liquides les plus altérables, tels que le bouillon de ménage, l'eau de levûre, l'urine, etc., se conservaient parfaitement. On objecta que l'air, ayant été calciné, avait peut-être perdu un principe subtil, inconnu d'ailleurs, mais nécessaire pour provoquer les fermentations, et que les résultats ne seraient pas les mêmes si, au lieu d'air calciné, on faisait rentrer dans le ballon de l'air ordinaire dépouillé de toutes ses poussières. M. Pasteur étira alors le ballon en forme de col de cygne (*fig. 1*) après y avoir introduit le liquide fermentescible. Il fit bouillir pendant quelques instants et, au moment de cesser l'ébullition, il plaça en *a* une petite bourre d'amiante venant d'être passée dans la flamme d'une lampe à alcool. L'air qui rentre pendant le refroidissement filtre sur la

bourre, où il dépose toutes les poussières qu'il renferme. Il faut ajouter que, le plus souvent, cette bourre n'est même pas indispensable, car l'air, rentrant lentement, dépose toutes ses poussières dans les sinuosités du col de l'appareil. Des ballons préparés de cette manière par

Fig. 1.

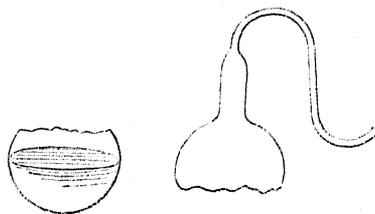


M. Pasteur, depuis plus de quinze ans, en sont la meilleure preuve : ils sont complètement recouverts de poussière, et cependant le liquide intérieur est parfaitement limpide et intact. Remarquons que l'air se renouvelle constamment par suite de la diffusion et des variations de température et de pression.

A cette expérience M. Fremy répond :

« Si les liquides fermentescibles placés dans les ballons de M. Pasteur n'éprouvent plus d'altération, ce n'est pas parce que ces liquides ont été mis à l'abri des germes de ferments par les sinuosités du col de

Fig. 2.



l'appareil : c'est simplement parce que le liquide producteur a été tué par l'ébullition » (p. 25). Mais enlevons la partie supérieure du ballon (fig. 2), ainsi que l'a indiqué M. Pasteur dans son Mémoire de 1862, ou

encore faisons bouillir le liquide dans un ballon sans précautions particulières; quelques jours après, les organismes pullulent.

D'ailleurs, M. Fremy ne paraît pas satisfait de son interprétation, car il ajoute immédiatement : « On peut même expliquer la stérilité des liquides placés dans les ballons sans avoir recours à l'explication fondée sur l'action de la chaleur, mais en se fondant sur l'altération de l'air, comme M. Victor Meunier l'a proposé le premier dans un travail très-important. Je démontrerai, par de nombreuses observations, que tout liquide organique abandonné dans un ballon à col effilé agit rapidement sur l'air; lors même que le col est ouvert, l'oxygène s'y trouve bientôt remplacé par de l'acide carbonique; or, dans un pareil mélange d'azote et d'acide carbonique, les phénomènes d'organisation deviennent impossibles; les ferments ne peuvent donc pas y prendre naissance » (p. 25).

Mais M. Pasteur a donné depuis longtemps des analyses d'air de ballons conservés par l'ébullition, et il a reconnu que la composition de cet air était à très-peu près la même que celle de l'air atmosphérique ordinaire. Voici quelques-uns des nombres que j'extraits de son Mémoire de 1862 :

Analyse, le 14 avril 1860, d'un ballon d'urine qui était à l'étuve depuis le 13 février :

O.....	19,3
CO ²	3,9
Az par différence.....	76,8
	<hr/>
	100,0

Analyse d'un ballon de lait chauffé à 110 degrés :

O.....	18,37
CO ²	0,16
Az par différence.....	81,47
	<hr/>
	100,00

En 1865, la Commission nommée par l'Académie des Sciences ⁽¹⁾, pour juger le différend existant entre M. Pasteur et MM. Pouchet, Joly

⁽¹⁾ Commissaires : MM. Flourens, Dumas, Milne Edwards, Balard, rapporteur. (*Comptes rendus*, t. LX, p. 384.)

et Musset, constata que, dans un ballon d'eau de levûre conservée depuis quatre ans par M. Pasteur, la composition de l'air était « exactement » la même que celle de l'air atmosphérique.

Bien plus, M. Fremy a donné lui-même des analyses d'air faites sur des ballons à col effilé et recourbé, et j'y trouve les nombres suivants (p. 96):

NATURE DES SUBSTANCES mises en expérience.	DATE de la mise en expérience.	DATE de l'analyse.	TEMPÉRA- TURE du chauffage.	DURÉE du chauffage.	QUANTITÉS d'oxygène et d'acide carbonique contenues dans les ballons après l'expérience.	
					Oxygène pour 100 d'air.	Acide carbonique pour 100 d'air.
Lait normal	2 mars.	20 nov.	100°	10 ^m	20	0
Id	20 févr.	20 nov.	100	15 ^m	21	0
Id	20 nov.	2 déc.	100	5 ^m	20	0
Id	23 févr.	23 nov.	110	30 ^m	21	0
Id	23 févr.	23 nov.	115	1 ^h	21	0
Lait sucré et carbonate de chaux.	8 févr.	27 nov.	100	30 ^m	21	0
Moût de bière	24 juill.	26 nov.	100	4 ^h	21	0
Jus de raisin filtré.....	7 oct.	25 nov.	100	2 ^m	21	0
Jus de raisin éclairci à l'air.....	2 mars.	25 nov.	100	2 ^m	21	0
Eau sucrée + levûre.....	21 févr.	24 nov.	100	3 ^m	21	0
Bouillon de levûre + poussières.	18 févr.	23 nov.	100	15 ^m	21	0

Dans toutes ces expériences, il ne s'est pas formé trace d'acide carbonique. Dans le même Tableau, on trouve, il est vrai, des analyses dans lesquelles l'oxygène a presque complètement disparu et se trouve remplacé par de l'acide carbonique; mais je ferai remarquer que ces nombres se rapportent à des liquides qui n'ont pas été soumis à l'ébullition et qui, par conséquent, ont dû s'altérer. Or M. Pasteur a montré que, par l'altération, l'oxygène disparaît rapidement.

Revenons à la première explication, d'après laquelle les substances hémiorganisées auraient été tuées par l'action de la chaleur. Si l'on coupe le col du ballon de façon à mettre le liquide au libre contact de l'air, non dépouillé de ses poussières, l'altération ne tarde pas à se produire. Comme M. Fremy n'admet pas l'existence des germes de

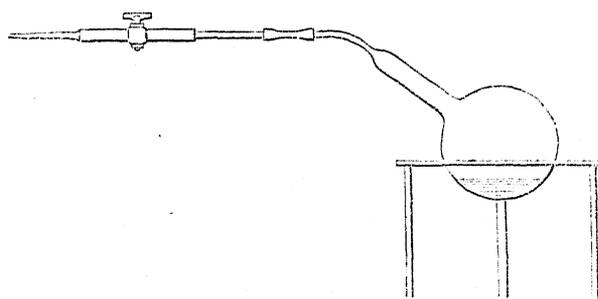
ferments dans l'air, cette expérience suffirait pour infirmer son interprétation. Mais nous verrons que les germes des ferments existent dans l'air. Les partisans de l'hémiorganisme pourraient donc admettre ce dernier fait, pour expliquer l'expérience précédente, et soutenir néanmoins que les substances organiques naturelles placées dans des conditions convenables peuvent engendrer directement des ferments sans l'intervention des germes extérieurs.

Conservation de l'urine et du sang retirés directement de l'organisme.

Il n'y avait qu'un moyen de lever cette objection : c'était d'obtenir des liquides naturels n'ayant pas été chauffés, et cependant se conservant sans altération à l'abri des poussières de l'air. C'est ce que fit M. Pasteur. Il annonça en effet, en 1863, que du sang et de l'urine, retirés directement de l'organisme, avec les précautions nécessaires pour éviter l'accès des poussières de l'air, pouvaient se conserver indéfiniment sans qu'on vit jamais apparaître dans leur intérieur le moindre organisme microscopique. Voici comment il opérait (1) :

« Je me suis servi, dit-il, d'un ballon de verre joint à un robinet de laiton par un tube de caoutchouc, comme l'indique la *fig. 3*. Les deux

Fig. 3.



branches du robinet ont environ 0^m,12 ; celle qui est libre est un peu effilée, comme l'extrémité d'une canule. Afin de purger ce ballon de

(1) Voir *Études sur la bière*, p. 46.

tout germe intérieur, on fait communiquer l'extrémité libre du tube de laiton avec un tube de platine fortement chauffé, après avoir eu soin d'introduire dans le ballon une petite quantité d'eau qu'on réduit en vapeur; puis on laisse refroidir le ballon dans lequel rentre de l'air qui a passé par le tube chaud.

» On peut faire bouillir l'eau dans le ballon à une température supérieure à 100 degrés, en adaptant à l'extrémité libre du tube de platine un tube de verre recourbé à angle droit, qui plonge plus ou moins dans une cuvette profonde remplie de mercure. Pendant que l'eau est en ébullition sous pression, on sépare le tube qui plonge dans le mercure : l'eau continue à bouillir dans le ballon à la pression ordinaire; on laisse alors refroidir le ballon, qui se remplit peu à peu d'air porté à une température élevée, plus que suffisante pour brûler toutes les poussières organiques que cet air peut renfermer.

» Quand le ballon est refroidi, on le détache après avoir fermé le robinet, et l'on passe à la préparation d'autres ballons semblables. Il est utile de fermer le robinet du ballon lorsque la température de ce dernier est encore de quelques degrés au-dessus de la température ambiante; par cette précaution, l'air du ballon refroidi se trouve à une pression moindre que la pression extérieure.

» Dans l'intervalle qui s'écoule entre la préparation d'un ballon et le moment où l'on s'en sert, il est bon de tenir la branche libre du robinet inclinée vers le bas, afin de garantir l'intérieur de son canal contre le dépôt des poussières extérieures. Quoi qu'il en soit, au moment où l'on doit mettre le ballon en expérience, il faut avoir soin de chauffer cette branche à l'aide de la flamme d'une lampe à alcool.

» S'agit-il de l'étude du sang, on le prendra sur un animal vivant, un chien, par exemple; on met à nu une veine ou une artère de l'animal, on pratique une incision dans laquelle est introduite l'extrémité de la branche libre du robinet, préalablement chauffée et refroidie, qu'on fixe par une ligature dans la veine ou l'artère, puis on ouvre le robinet: le sang coule dans le ballon; on referme le robinet et l'on porte le ballon dans une étuve à une température déterminée.

» Pour l'urine on opère à peu près de la même manière. L'extrémité de la branche libre du robinet est introduite dans le canal de l'urèthre;

au moment de l'émission de l'urine on tourne le robinet, et l'urine est lancée dans le ballon, qu'on remplit à moitié ou au tiers environ.

» Voici les résultats de ces expériences :

» Le sang ne se putréfie pas, même aux plus hautes températures de l'atmosphère; son odeur reste celle du sang frais ou prend une odeur de lessive.

» L'urine se comporte d'une manière analogue : elle n'éprouve aucune altération profonde; sa coloration prend seulement une teinte brun rougeâtre; elle dépose des cristaux en petite quantité, mais sans se troubler ni se putréfier d'aucune façon. »

A ces résultats M. Fremy répond que « la conservation des liquides organiques n'est pas due, comme le pense M. Pasteur, à l'absence des poussières atmosphériques, mais, comme le disait Needham, *aux exhalaisons du liquide organique, qui altèrent l'air des appareils et empêchent les ferments de se développer*. Je soutiens, dit-il, que, dans tous les appareils où un liquide organique se conserve, l'air ne présente plus sa composition normale » (p. 29).

A cet effet il donne des analyses qu'il a faites sur l'air contenu dans des ballons à col effilé et recourbé dans lesquels se trouvaient des liquides organiques *non chauffés*. Voici quelques-uns des nombres que j'y trouve (p. 96) :

NATURE DES SUBSTANCES mises en expérience.	DATE de la mise en expérience.	DATE de l'analyse.	QUANTITÉS d'oxygène et d'acide carbonique contenues dans les ballons après l'expérience.	
			Oxygène pour 100 d'air.	Acide carbonique pour 100 d'air.
Lait normal.....	20 novembre.	23 novembre.	0	18
Id.....	20 novembre.	25 novembre.	0	19
Lait récemment trait.....	27 novembre.	2 décembre.	0	22
Id.....	27 novembre.	29 novembre.	12	5
Lait sucré.....	20 mars.	25 novembre.	0	19
Moût de bière.....	23 juillet.	26 novembre.	2	22
Jus de raisin limpide.....	6 novembre.	28 novembre.	4	86
Jus de raisin trouble.....	10 octobre.	25 novembre.	16	12
Jus filtré.....	10 octobre.	25 novembre.	11	24

« Ces résultats, dit M. Fremy, conduisent aux conséquences suivantes, qui me paraissent importantes au point de vue de la discussion que je soutiens contre M. Pasteur :

» 1° Les liquides organiques abandonnés dans un ballon à col effilé, recourbé et ouvert, peuvent, suivant leur nature, agir sur l'atmosphère du ballon et modifier profondément sa composition. Dans ce cas, l'oxygène de l'air est absorbé par la substance organique et remplacé d'une manière plus ou moins complète par de l'acide carbonique.

» 2° Cette absorption de l'oxygène par les substances hémiorganisées se fait souvent avec une grande rapidité (p. 98).

» 3° Les analyses consignées dans le Tableau précédent prouvent que des ballons dont le col effilé est resté ouvert pendant près d'une année contiennent, dans leur intérieur, un gaz bien différent de l'air atmosphérique, et qui est formé presque exclusivement d'azote et d'acide carbonique.

» Ainsi, dans l'appareil à col effilé, recourbé en col de cygne et ouvert, qui a été employé si fréquemment par M. Pasteur, l'air se modifie, quant à sa composition chimique, sous l'influence des liquides organiques qui s'y trouvent; par conséquent, ces liquides, abandonnés dans des appareils de cette nature, ne sont pas dans des conditions normales; les phénomènes qui s'y produisent ne peuvent donc pas être comparés à ceux qui se réaliseraient dans de l'air atmosphérique ordinaire (p. 99).

» 4° Lorsque M. Pasteur montre des liquides organiques qui se conservent dans des appareils fermés ou dans des ballons à col effilé et ouvert, et qu'il attribue leur conservation à l'absence des germes de l'air, on peut lui dire que cette conservation est due, soit à l'ébullition qui a tué la substance hémiorganisée vivante contenue dans le liquide, soit à la décomposition qu'éprouve l'air dans son contact avec les corps organiques; dans ce dernier cas, c'est l'acide carbonique produit aux dépens de l'oxygène atmosphérique qui s'oppose à l'altération du liquide, lors même qu'il n'a pas été porté à l'ébullition » (p. 101).

Mais remarquons que M. Fremy ne s'est pas placé dans les mêmes conditions que M. Pasteur. En effet, dans les expériences de M. Pasteur, le liquide organique se *conserve*, tandis que dans celles de M. Fremy il

s'altère. Le lait, sur lequel opère de préférence M. Fremy, est précisément un liquide des plus difficiles à conserver. Comme l'a montré M. Pasteur, la composition de l'air d'un ballon se modifie profondément lorsque le liquide s'altère, mais les conséquences qu'on déduit de ce fait ne prouvent absolument rien pour le cas où il y a conservation.

Pour réfuter les expériences de M. Pasteur, M. Fremy cite encore le fait suivant (p. 104) :

« J'ai introduit, dit-il, dans des ballons dont le col était ensuite fermé à la lampe, et qui contenaient, par conséquent, de l'air ordinaire, des liquides organiques, tels que du sang sortant des veines d'un chien, de l'urine au moment de son émission et différents sucs de fruits.

» Ces liquides, avant d'être placés dans les ballons, ont été exposés à l'air; les sucs de fruits ont même été filtrés lentement et soumis pendant plusieurs heures à l'influence des poussières atmosphériques.

» Dans la théorie de M. Pasteur, ces liquides, ayant été exposés à l'air et abandonnés dans de l'air ordinaire non purifié, devraient être chargés de germes atmosphériques et s'altérer toujours.

» Eh bien, dans de nombreuses observations, j'ai constaté que ces liquides se conservent souvent sans altération. Il y a quelques jours, j'ouvrais, devant plusieurs chimistes attachés à mon laboratoire, des ballons contenant du sang et de l'urine, abandonnés depuis un an dans de l'air ordinaire; ces liquides ne paraissaient pas altérés; ils n'avaient pas d'odeur désagréable et n'avaient pas dégagé de gaz.

» J'attribue ces résultats à l'action chimique des liquides qui absorbent rapidement l'oxygène et qui produisent une atmosphère d'azote et d'acide carbonique, dans laquelle les organismes ne peuvent pas se développer ».

« Ces liquides ne paraissaient pas altérés », mais je ne trouve aucune observation microscopique pour le prouver. En admettant que ces ballons ne soient pas altérés, on doit se demander alors comment il se fait que *tous* les ballons ne se conservent pas. Est-ce que l'action chimique des liquides sur l'air ne se produirait pas dans tous? Ce que je puis affirmer, c'est que, dans un grand nombre d'expériences faites sur l'urine, il ne m'est arrivé qu'une seule fois de ne pas avoir d'altération.

Loin d'attribuer ce résultat à l'action chimique du liquide qui modifie la composition de l'air placé au-dessus, je l'attribue à ce que, par hasard, il n'y avait pas de germes dans ce ballon. Si les germes se trouvent très-répandus dans l'air, particulièrement pour les organismes qui peuvent se développer dans l'urine et dans le sang, cependant jamais M. Pasteur n'a avancé que, dans la plus petite parcelle d'air, il devait nécessairement y en avoir : il a prouvé le contraire ⁽¹⁾. Nous verrons, en particulier, que les germes des ferments alcooliques sont peu nombreux dans l'air, surtout à certaines époques de l'année.

Examinons l'assertion de M. Fremy, d'après laquelle la conservation du sang et de l'urine non chauffés, serait due à une modification « profonde » dans la composition de l'air du ballon.

D'abord, M. Pasteur a constaté que ⁽²⁾, « contrairement à ce qu'on aurait pu croire, l'oxydation directe des principes du sang par combustion lente n'est pas très-active : après une exposition des ballons dans une étuve à 25 ou 30 degrés, pendant plusieurs semaines, on n'observe encore qu'une absorption de 2 à 3 pour 100 de gaz oxygène, lequel est remplacé par un volume sensiblement égal de gaz acide carbonique.

» L'oxydation directe des matériaux de l'urine est également très-faible. Après quarante jours, l'analyse de l'un des ballons a fourni :

O.....	19,2
CO ²	0,8
Az.	80,0
	100,0

Ainsi la proportion d'acide carbonique est très-faible, lors même que le ballon est complètement fermé.

Voici maintenant des analyses que j'ai faites sur des ballons d'urine communiquant librement avec l'air. Nous verrons tout à l'heure comment ils avaient été préparés. Au bout de dix jours, pendant lesquels

⁽¹⁾ Voir son Mémoire de 1862, déjà cité.

⁽²⁾ *Études sur la bière*, p. 49.

la température avait été de 25 à 30 degrés, j'ai obtenu :

O.	18,3
CO ²	1,8
Az.	79,9
	<hr/>
	100,0

L'analyse de l'air d'un autre ballon conservé depuis neuf mois environ a donné :

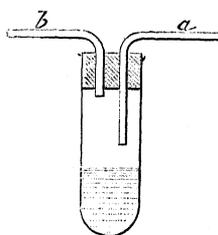
O.	17,8
CO ²	2,1
Az.	81,1
	<hr/>
	100,0

De tous ces résultats on peut conclure que la proportion d'acide carbonique contenue dans l'air des ballons d'urine naturelle conservée est toujours très-faible; cependant ce gaz y existe en petite quantité d'une façon constante, et les adversaires de la théorie de M. Pasteur pourraient vouloir que l'air fût de composition normale.

Faisons mieux, pour juger nettement leur hypothèse : mettons de l'urine fraîche en contact avec une atmosphère d'acide carbonique ou d'azote, ou d'un mélange de ces deux gaz. Dans l'hypothèse de M. Fremy, *a fortiori*, il ne doit pas y avoir d'altération.

J'ai donc pris des tubes à essai dans lesquels j'ai mis de l'urine

Fig. 4.



au moment de son émission. Les tubes étaient fermés par un bouchon de caoutchouc percé de deux trous, dans lesquels passaient deux tubes de verre recourbés à angles droits, comme l'indique la *fig. 4*. L'un des

tubes *a* descendait tout près du niveau du liquide, et c'est par ce dernier qu'on faisait arriver le courant d'acide carbonique ou d'azote. En recueillant le gaz qui se dégage par l'autre tube, il est facile de constater le moment où tout l'air a été chassé et remplacé par du gaz pur. Ce résultat est atteint pour l'acide carbonique, lorsque le gaz qui se dégage est complètement absorbé par la potasse, et pour l'azote (préparé en faisant passer un courant d'air sur de la tournure de cuivre chauffée) lorsqu'il n'y a plus d'absorption par l'acide pyrogallique et la potasse. Pour avoir une atmosphère d'acide carbonique et d'azote, je faisais passer quelques bulles d'acide carbonique dans le tube préalablement rempli d'azote.

A l'aide d'une lampe d'émailleur, je fermais les tubes coudés en *a* et *b*. Dans certains cas, je n'attendais pas que le gaz qui se dégageait fût pur; je me rapprochais ainsi davantage des conditions dans lesquelles se trouve placée l'urine normale pendant sa conservation. Les tubes furent alors placés dans l'étuve, à la température de 25 ou 30 degrés, avec d'autres tubes témoins dans lesquels se trouvait de l'air ordinaire.

Résultats. — Dans tous les cas il y eut altération; le liquide commençait à se troubler au bout de quelques jours; on vérifiait avec le papier de tournesol qu'il était devenu alcalin, tandis qu'il était acide primitivement. En même temps on constatait au fond des tubes la présence du petit ferment de l'urée. Dans les tubes où il y avait de l'air, il se formait assez souvent un voile blanchâtre à la surface. Ce voile, déjà signalé par M. Pasteur, apparaît fréquemment sur l'urine abandonnée au contact de l'air à une température inférieure à 20 degrés; il est formé de cellules rondes dont les dimensions sont plus petites que celles de la levûre de bière. Quelquefois aussi on voyait apparaître des moisissures au bout de deux ou trois jours; dans ce cas, l'oxygène était rapidement absorbé et l'urine se trouvait en contact d'un mélange d'azote et d'acide carbonique. L'altération se produisait à peu près en même temps dans les différents tubes.

Ces résultats nous permettent de conclure rigoureusement que la conservation de l'urine normale ne peut pas être attribuée à l'altération dans la composition de l'air des ballons, comme le pense M. Fremy. Il y a plus : on peut mettre de l'urine dans des tubes effilés et les fermer

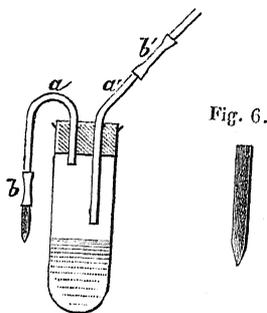
ensuite à la lampe de façon à laisser une quantité d'air presque insignifiante : l'altération se produit encore.

Comme l'altération de l'air dans les ballons où l'on conserve des liquides organiques naturels non chauffés est la seule cause que puissent invoquer les partisans de l'hémiorganisme pour soutenir leur théorie, il m'a paru important de montrer que ces liquides organiques peuvent se conserver en présence d'un air ayant exactement la même composition que l'air atmosphérique. Pour cela, il fallait faire passer un courant d'air continu dans les appareils.

J'ai adopté à cet effet la disposition suivante :

Au lieu d'un ballon pour recevoir l'urine, je me sers d'un tube à essai, fermé par un bouchon de caoutchouc percé de deux trous, dans chacun desquels passe un petit tube de verre, *a*, *a'* (*fig. 5*), portant à son extrémité un tube de caoutchouc *b*, *b'*. L'un de ces tubes *a* est recourbé, l'autre est seulement incliné, comme le montre la figure. Je mets de l'eau distillée au fond du tube et je la fais bouillir; la vapeur s'échappe par les caoutchoucs *b* et *b'*. Je pince alternativement chacun

Fig. 5.



d'eux de façon à forcer la vapeur d'eau à sortir tantôt par l'un, tantôt par l'autre. Lorsque l'ébullition a duré quelques minutes, je bouche le caoutchouc *b'* avec un tube de verre plein venant d'être passé dans la flamme; la vapeur continue à se dégager en *b*. Après une ou deux minutes, j'arrête l'ébullition de l'eau et immédiatement j'introduis un tube de verre rempli d'amiante flambé (*fig. 6*) dans le caoutchouc *b*. Pendant le refroidissement, l'air qui rentre dans l'appareil filtre à tra-

vers cette colonne d'amiante, sur laquelle se déposent toutes les poussières. On prépare ainsi une série de tubes semblables.

Au moment où l'on veut s'en servir, on commence par flamber le caoutchouc *b'*, ainsi que le tube plein; on retire ce dernier et on le remplace par un tube creux ouvert à ses deux extrémités et qui vient d'être flambé; on pince le caoutchouc *b'* à l'aide d'une pince de Mohr, on introduit l'extrémité libre du tube creux dans le canal de l'urèthre, on ouvre la pince, et, pendant que l'urine coule dans le tube, l'air s'échappe par la branche recourbée et le tube d'amiante placé à l'extrémité. Lorsque le niveau de l'urine est voisin de l'extrémité du tube *a'*, on pince de nouveau le caoutchouc *b'*, on retire le tube du canal, et immédiatement on y adapte un caoutchouc sortant de l'eau bouillante et un tube d'amiante identique à celui qui est à l'extrémité de la branche recourbée. On enlève la pince; l'urine qui était restée dans le tube incliné achève de s'écouler et l'air qui remplace le liquide filtre à travers le second tube d'amiante.

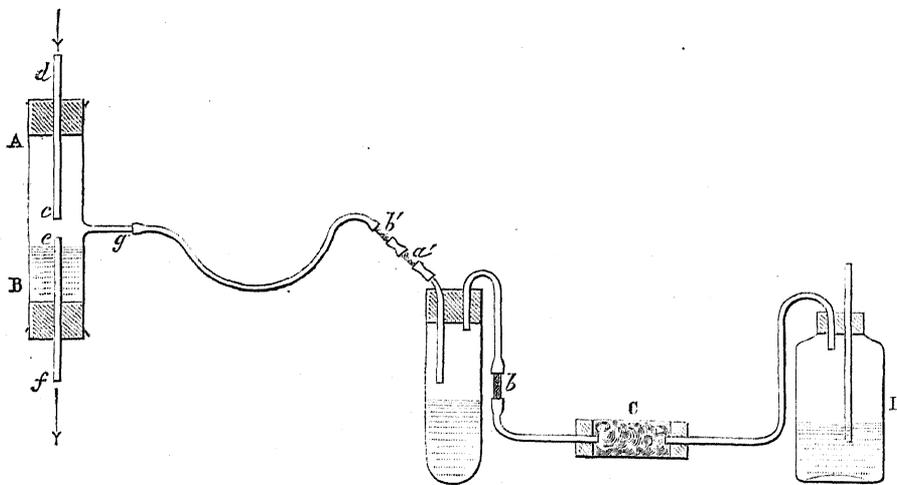
Par cette méthode, l'urine se conserve presque toujours sans altération; quelques flocons de mucus se déposent au fond des tubes ainsi que des cristaux rougeâtres d'acide urique. Sur plus de trente tubes faits de cette manière, quatre ou cinq seulement se sont altérés.

Il peut paraître assez surprenant, au premier abord, que, malgré toutes les précautions indiquées ci-dessus, il y ait toujours un petit nombre de tubes qui s'altèrent; mais il faut remarquer qu'il y a deux instants pendant lesquels les poussières de l'air peuvent pénétrer dans l'appareil, savoir: lorsque le tube de verre va être introduit dans le canal de l'urèthre et lorsqu'on le retire avant de mettre le caoutchouc muni de son tube d'amiante. Ces instants sont très-courts, il est vrai, mais enfin ils peuvent suffire dans quelques cas pour permettre l'introduction des poussières et provoquer l'altération de l'urine. Mais il y a une autre cause d'altération beaucoup plus importante que les deux précédentes: je veux parler des organismes et du ferment ammoniacal, qui doivent se trouver fréquemment à l'orifice du canal de l'urèthre. En effet, après chaque émission d'urine, il reste toujours à l'extrémité du canal une petite quantité de liquide dans lequel le ferment de l'urée peut se développer. Aussi suffit-il souvent de laver cette extrémité avec une goutte d'eau distillée et d'examiner cette goutte au mi-

croscopie pour constater l'existence de ce ferment. Il faut donc avoir soin, au moment où l'on introduit le tube de verre, de ne pas toucher à la partie du canal qui est au contact de l'air. Il vaudrait même mieux, comme le conseille le D^r Lister, d'Édimbourg, laver cette extrémité avec une dissolution d'acide phénique au $\frac{1}{40}$. Mais, comme on aurait pu objecter que la trace d'acide phénique restant s'opposait à l'altération, j'ai préféré obtenir de l'urine tout à fait naturelle et ne pas me servir de la dissolution d'acide phénique.

Maintenant que nous sommes en possession d'un procédé nous donnant presque à coup sûr de l'urine stérile, il est très-facile de faire passer un courant d'air continu dans le tube. Je me suis servi, à cet effet, d'une petite trompe en verre formée d'un tube AB, d'un diamètre de 2 centimètres environ, fermé à chacune de ses extrémités par un bouchon de caoutchouc traversé par de petits tubes de verre dont les extrémités *c* et *e* sont voisines l'une de l'autre (*fig. 7*). En face se trouve

Fig. 7.



un petit tube *g*, soudé sur le grand tube AB. A l'aide d'un caoutchouc on fait communiquer ce tube *g* avec le tube d'urine; ce dernier est lui-même en communication d'abord avec un tube rempli de coton C, puis avec un flacon D contenant de l'eau distillée. Ce flacon est destiné à montrer le passage de l'air. On met l'extrémité *d* en communication

avec un robinet qu'on tourne de façon que l'eau s'écoule goutte à goutte par l'extrémité *c*. On constate alors que chaque goutte, en pénétrant dans le tube *ef*, entraîne une bulle d'air; on a donc une aspiration dans le tube d'urine. On peut, avec cette petite trompe, faire passer le courant d'air aussi lentement qu'on le veut, chaque goutte d'eau produisant une aspiration d'une bulle d'air, comme l'indique le flacon D.

Pendant vingt jours consécutifs, j'ai fait passer ainsi un courant d'air continu dans un tube d'urine normale à la température de 25 degrés environ. Au bout de ce temps, l'urine était restée parfaitement limpide, sans avoir donné naissance à la moindre production organique. Au papier de tournesol, elle était acide comme avant le passage de l'air.

J'ai cessé l'expérience au bout de vingt jours, pensant que ce temps était bien suffisant, car généralement l'urine s'altère et se trouble à la température de 25 degrés au bout de deux ou trois jours environ. Il est évident qu'on aurait pu prolonger l'expérience aussi longtemps qu'on l'aurait voulu, et le résultat aurait été le même.

Le tube de coton C a pour but d'arrêter les poussières venant du flacon, dans le cas où le petit tube d'amiante qui est en *b* ne suffirait pas pour arrêter toutes les poussières d'un courant d'air qui dure aussi longtemps.

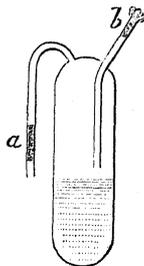
Remarquons que l'air qui est dans le tube d'urine a exactement la même composition que l'air extérieur; on ne peut même pas invoquer la formation d'une couche d'acide carbonique à la surface du liquide, car un des petits tubes *a'*, *b'* descend tout près du niveau de l'urine. De plus, le courant d'air commence à passer dès que l'urine a été introduite dans le tube. Cette précaution n'est pas inutile, car, si l'on attendait quelque temps avant de faire passer ce courant d'air, les partisans de la théorie de l'hémiorganisme pourraient objecter que la matière albuminoïde qui, d'après eux, produit les ferments a été tuée par la très-petite quantité d'acide carbonique formé. Je dois faire observer, d'ailleurs, que, l'oxydation de l'urine ayant toujours lieu, on n'opérerait plus sur un liquide de même nature et de même composition.

Au moment où j'ai fait ces expériences, je pensais qu'il suffisait de faire bouillir de l'eau pendant quelques minutes dans un appareil pour le priver complètement de germes; mais j'ai découvert depuis, comme je le montrerai plus loin, qu'il existe certains organismes dont les

germes ou spores peuvent résister pendant plus d'une heure à la température de l'eau bouillante. Comment se fait-il donc que l'urine soit restée intacte dans des tubes où l'eau n'avait bouilli que pendant un quart d'heure au plus ? Cela tient à ce que l'urine introduite était très-notablement acide et que les spores des organismes résistant à la température de 100 degrés ne se développent facilement que dans des liquides presque neutres, ou mieux légèrement alcalins. Or, il pourrait arriver que l'urine eût précisément cette réaction légèrement alcaline, bien que ne renfermant pas d'organismes. Dans ce cas, pour avoir la conservation, il faut flamber séparément à la lampe à alcool le tube à réactif, le bouchon de caoutchouc et les deux petits tubes qui le traversent. J'ai préparé ainsi, au commencement de l'année 1877, des tubes dans lesquels l'urine introduite était acide, neutre ou légèrement alcaline. Tous ces tubes se sont très-bien conservés, même après avoir été placés à l'étuve à 25 ou à 50 degrés.

Mais le flamage séparé des différentes parties d'un appareil comme celui que je viens de décrire est assez délicat, et l'on est exposé à des causes d'erreur provenant des germes répandus dans l'air. Aussi, dans ce cas, vaut-il mieux supprimer le bouchon de caoutchouc et se servir d'un tube de verre sur lequel sont soudés deux tubes plus petits *a* et *b*, comme le montre la *fig.* 8. Dans le tube *a* et à l'extrémité du tube *b* on

Fig. 8.



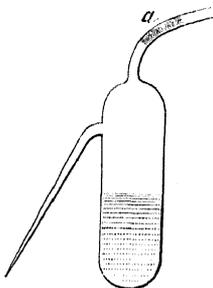
introduit un tampon de coton. On porte une série de tubes semblables dans un fourneau à gaz, à la température de 200 à 250 degrés. Lorsque le coton a pris une teinte jaunâtre, tous les germes pouvant exister dans les tubes sont tués; on les retire, et, lorsqu'on veut introduire l'urine, on enlève le tampon de coton situé à l'extrémité du tube *b* et l'on adapte un

tube de caoutchouc sortant de l'eau acidulée bouillante, suivi d'un tube en verre creux flambé. Le reste de l'opération s'achève comme précédemment.

Ainsi, en prenant des précautions convenables, on peut avoir de l'urine acide, neutre ou légèrement alcaline, se conservant indéfiniment au contact de l'air, même à la température de 50 degrés. Je cite cette dernière température parce qu'elle est plus favorable que celle de 25 ou 30 degrés pour le développement de certains organismes, en particulier ceux dont les spores résistent à la température de 100 degrés (1).

J'ai fait aussi, quoique d'une façon incidente, des expériences sur la conservation du sang au contact de l'air. Le procédé consiste à faire passer le sang du corps d'un animal dans un appareil flambé contenant de l'air pur et restant ensuite en communication avec l'air extérieur. On arrive très-facilement à ce résultat avec des tubes de verre ayant la forme indiquée par la *fig.* 9. On flambe ces tubes dans un fourneau à

Fig. 9.



gaz, après avoir mis un tampon de coton en *a*. Si l'on dispose d'un animal vivant, on met à nu une veine ou une artère dans laquelle on fait une incision et l'on introduit l'extrémité effilée *b* qu'on vient de couper et de passer dans la flamme. Le sang coule de lui-même; on peut faciliter son écoulement en aspirant avec la bouche par le tube *a*. On ferme ensuite l'effilure à la lampe.

(1) Dans un travail publié au mois d'octobre 1877 dans la *Revue mensuelle de Médecine et de Chirurgie*, MM. les docteurs Paul Cazeneuve et Charles Livon ont montré que, en enlevant la vessie d'un animal, l'urine qui y est contenue, et qui se trouve ainsi constamment au contact des parois, se conserve intacte sans donner naissance au moindre organisme microscopique, que cette urine soit acide ou alcaline et quelle que soit la température.

Si l'on ne dispose pas d'un animal vivant, on prend le cœur d'un animal qui vient d'être tué, dans un abattoir par exemple, on perce la paroi à l'aide d'un scalpel flambé et l'on plonge la pointe effilée, préalablement coupée et flambée. On aspire par le tube en *a*. Ordinairement, il reste suffisamment de sang dans le cœur pour pouvoir remplir le tube à moitié. On ferme toujours l'effilure à la lampe.

On a ainsi, en contact continu avec l'air par le tube *a*, du sang normal qui se conserve indéfiniment soit à la température de 25 à 30 degrés, soit à la température de 50 degrés (1).

Fermentation des fruits sucrés plongés dans le gaz acide carbonique.

M. Fremy crut rencontrer « une démonstration rigoureuse de l'hémiorganisme » (p. 189) dans les fermentations qu'éprouvent les fruits sucrés plongés dans le gaz acide carbonique, fermentations étudiées pour la première fois par MM. Lechartier et Bellamy, en 1869.

Voici le fait : si l'on abandonne un fruit bien mûr dans un flacon portant un tube pour laisser dégager les gaz, on constate bientôt que tout l'oxygène du flacon est absorbé, puis il se dégage de l'acide carbonique; si l'on distille le fruit, on trouve de l'alcool. C'est aux dépens du sucre que l'acide carbonique et l'alcool se sont formés. Cette fermentation, à laquelle M. Fremy donne le nom de *fermentation intracellulaire*, puisqu'elle se produit, dit-il, à l'intérieur des cellules, n'a pas lieu tant que le fruit peut absorber de l'oxygène, mais elle se manifeste dès que tout l'oxygène a été transformé en acide carbonique. On sait, en effet, que les fruits absorbent l'oxygène de l'air en dégageant un volume à peu près égal de gaz acide carbonique; aussi la fermentation intracellulaire se produit-elle immédiatement si l'on met les fruits, dès le début, dans de l'acide carbonique, comme l'a constaté M. Pasteur.

Jusque-là cette expérience est parfaitement conforme à la théorie générale de la fermentation exposée par M. Pasteur dans son Ouvrage intitulé : *Études sur la bière*. Il démontre, en effet, que le caractère ferment tient à ce que certaines cellules peuvent se multiplier ou

(1) Au laboratoire de M. Pasteur, ces procédés et ce maniement de liquides naturels sont journellement employés.

simplement *continuer à vivre* à l'abri de l'oxygène de l'air. C'est ainsi que beaucoup de moisissures peuvent jouer le rôle de ferment pendant un certain temps lorsqu'on les submerge dans un liquide sucré. Au contraire, la levûre de bière, qui est le ferment alcoolique par excellence, ne décompose qu'une très-petite quantité de sucre si on lui fournit constamment de l'oxygène pendant son développement, tandis qu'elle en décompose beaucoup si elle est privée de cet oxygène. Les cellules du fruit continuant à vivre et ne pouvant plus absorber l'oxygène de l'air, il n'y a rien d'étonnant à ce qu'elles décomposent le sucre. C'est bien là la cause de la fermentation, car, si l'on broie le fruit de façon à détruire la vie des cellules, il ne se produit plus ni alcool ni acide carbonique.

Mais ce qui serait tout à fait contraire à la théorie de M. Pasteur et ce qui constituerait une démonstration de l'hémiorganisme, ce serait la présence de la levûre dans les fruits ayant ainsi fermenté, car, dans ce cas, les cellules du fruit auraient donné naissance spontanément à ces organismes. M. Fremy a annoncé à différentes reprises qu'il avait constaté la présence des cellules de levûre dans les fruits ayant ainsi fermenté. Il a opéré sur des poires, des raisins, des cerises, des groseilles, et voici sa conclusion :

« Tous ces fruits, une fois soustraits à l'influence de l'oxygène, ont éprouvé la fermentation intracellulaire; ils ont donné naissance à de l'acide carbonique et à de l'alcool; en examinant les sucres après la fermentation, j'ai toujours constaté dans ces liquides la présence de ferments organisés » (p. 184).

D'un autre côté, M. Pasteur avait été amené, comme conséquence de la théorie de la fermentation, à étudier la fermentation des fruits sucrés plongés dans le gaz acide carbonique, et jamais il ne put reconnaître la présence de cellules de levûre à l'intérieur. MM. Lechartier et Bellamy étaient arrivés au même résultat.

M. Fremy répondit :

« M. Pasteur connaît-il bien toutes les formes de ferment alcoolique? Elles changent avec les différents fruits; il en existe de presque imperceptibles qui ont à peine $\frac{1}{800}$ de millimètre de grosseur, tandis que la levûre de bière arrive à $\frac{1}{100}$ de millimètre.

» Les ferments alcooliques, étant organisés, n'arrivent pas immédia-

tement à leur grosseur normale : M. Pasteur peut bien ne pas avoir aperçu ceux qui se trouvaient dans les cellules des fruits » (p. 187).

Sans doute, on peut toujours supposer qu'on ne connaît pas toutes les formes du ferment alcoolique; dans tous les cas au moins, il eût été désirable que M. Fremy décrivît ces nouvelles formes.

Les choses en étaient là, M. Fremy affirmant avoir vu, et MM. Pasteur, Lechartier et Bellamy n'avoir rien vu, lorsque, au mois de juillet 1876, M. Fremy publia une Note dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, Note dans laquelle il déclarait de nouveau avoir vu des cellules de levûre dans des cerises ayant éprouvé la fermentation-intracellulaire.

Comme on était précisément à l'époque de la maturité des fruits, je voulus vérifier le fait annoncé par M. Fremy.

Le 19 juillet, je cueille au jardin du Luxembourg, grâce à l'obligeance de M. Rivière, jardinier en chef, différents fruits, tels que groseilles à maquereau, groseilles à grappes, cerises et prunes. Je choisis ces fruits, qui sont tous mûrs, aussi sains que possible, et, après les avoir enveloppés dans du papier de soie, je les rapporte au laboratoire. Je les distribue immédiatement dans des éprouvettes pleines de mercure, dans des éprouvettes contenant de l'acide carbonique, et enfin dans des flacons remplis de ce dernier gaz. Dans ce dernier cas, les fruits étaient suspendus à l'aide d'un fil aux bouchons des flacons.

Dès le lendemain, je constatais qu'il s'était dégagé de l'acide carbonique dans tous mes appareils; par conséquent, la fermentation intracellulaire s'était produite. Au bout de trois ou quatre jours, pendant lesquels le volume du gaz augmenta progressivement, j'examinai les fruits : ils étaient très-fermes, durs, le péricarpe était opaque comme dans les fruits qui ont été plongés dans l'eau-de-vie; évidemment ils contenaient de l'alcool.

Pour examiner le contenu au microscope, je commençai par enlever avec une petite pince chauffée la pellicule extérieure, de façon à empêcher tout contact entre cette pellicule, qui porte à sa surface externe des corpuscules organisés, et le parenchyme sous-jacent.

Le résultat de cet examen se trouve consigné dans une Note que j'ai publiée dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, en collabo-

ration avec M. Joubert, qui avait bien voulu se joindre à moi pour faire ces expériences. Nous n'avons jamais trouvé, dans nos différentes préparations, de cellules de levûre; on voit bien quelques cellules rondes, les unes très-petites, les autres grosses comme des cellules de mucor, mais elles sont peu visibles; le contour seul s'aperçoit nettement, et il n'est pas possible de les confondre avec des cellules de levûre, du moins avec toutes les levûres connues jusqu'ici. Ces cellules ont pu induire en erreur M. Fremy, mais on arrive à reconnaître que ce ne sont pas des cellules de levûre; une première preuve est fournie par ce fait qu'elles existent aussi dans les fruits qui n'ont pas subi la fermentation intracellulaire, ce qui montre qu'elles appartiennent au fruit lui-même. D'ailleurs, si l'examen microscopique peut toujours laisser un certain doute, il y a un moyen sûr de constater si, oui ou non, il y a de la levûre: c'est de mettre l'intérieur de ces fruits dans des tubes renfermant du moût de raisin bouilli. S'il y a un ferment, il se développera et fera fermenter le moût; si non, il n'y aura aucune fermentation. Mais cette expérience est délicate et elle doit être faite avec beaucoup de précautions. Les fruits portent souvent à leur surface des germes de ferment; si l'on introduit ces derniers dans le moût de raisin bouilli, il y aura fermentation, et l'on attribuera à des ferments internes ce qui est dû en réalité à des germes extérieurs. Pour éviter cette cause d'erreur, nous enlevons la pellicule avec un très-grand soin à l'aide d'une pince flambée, et nous prenons une partie du fruit à l'aide d'une cuiller d'argent également flambée. En opérant ainsi, nous n'avons pas eu une seule fois la fermentation du moût de raisin; par conséquent, il n'y avait certainement pas de cellules de levûre dans tous les fruits que nous avons examinés.

Comment se fait-il que M. Fremy soit arrivé à un résultat directement contraire? Je serais porté à croire qu'il s'est glissé une cause d'erreur dans ses expériences. Il serait assez difficile de préciser nettement cette cause d'erreur, parce que M. Fremy néglige de donner des détails qui auraient été cependant d'une grande utilité. Il ne dit nulle part qu'il ait pris des fruits bien sains cueillis sur l'arbre lui-même. Peut-être s'est-il servi de fruits achetés dans le commerce et, par conséquent, plus ou moins froissés et meurtris. De plus, ces fruits sont placés en assez grand nombre dans un flacon, d'où résulte nécessairement qu'ils pres-

sent les uns sur les autres, ce qui peut avoir pour effet de faire pénétrer à l'intérieur les germes qui existent à l'extérieur. La pellicule peut même se déchirer sous l'influence de la pression; alors l'introduction des germes est rendue beaucoup plus facile. M. Fremy dit bien, dans sa Note du 17 juillet 1876, qu'il lave les cerises avec de l'eau distillée avant de les introduire dans le flacon; mais ce lavage est tout à fait impuissant pour enlever tous les germes qui existent à la surface, car, en mettant des cerises ainsi lavées dans un flacon sortant de l'eau bouillante et les écrasant, on constate que la fermentation a lieu. Je crois que ce lavage est plutôt nuisible qu'utile, car il tend à détacher la queue du fruit et, par conséquent, à faciliter l'introduction des germes extérieurs.

Une autre cause d'erreur peut tenir à la durée pendant laquelle les fruits restent plongés dans le gaz acide carbonique. J'ai constaté effectivement que, au bout de six ou sept jours, on voyait très-nettement suinter des gouttelettes sur la pellicule. Il est évident que, si ces gouttelettes se trouvent en contact avec un germe extérieur, il y aura une fermentation qui pourra se propager dans l'intérieur. Il n'y a d'ailleurs aucun inconvénient à cesser l'expérience au bout de deux ou trois jours seulement, car la fermentation intracellulaire se produit immédiatement lorsque le fruit est plongé dans l'acide carbonique ou dans un gaz autre que l'oxygène, en particulier dans l'hydrogène⁽¹⁾; par conséquent, le ferment alcoolique devrait apparaître aussi immédiatement. A plus forte raison devrait-il se trouver très-développé au bout de deux ou trois jours, et surtout de quatre ou cinq.

Je pense que c'est là la principale cause d'erreur dans les expériences de M. Fremy; dans sa Note du 17 juillet 1876, il dit, en effet, qu'il a examiné les cerises contenues dans le flacon plein d'acide carbonique, environ un mois après la mise en expérience. Après ce temps, la pellicule d'un certain nombre était déchirée; par conséquent, du jus sucré s'était répandu sur les fruits et avait fermenté. Chaque cerise était pour ainsi dire enveloppée de ferment alcoolique; on conçoit

(1) Lorsque le fruit est placé dans une éprouvette contenant de l'air, on constate d'abord une absorption qui est due à la transformation de l'oxygène en acide carbonique et à l'absorption de ce gaz par le suc du fruit. La fermentation ne commence que lorsque tout l'oxygène a disparu.

alors combien il était difficile d'extraire la pulpe intérieure sans la mettre un peu en contact avec la surface ; ainsi s'explique pourquoi cette pulpe a fait fermenter du moût de raisin bouilli. Je ne parle ici que des cerises qui paraissaient saines ; quant à celles qui présentaient des déchirures, il est évident qu'elles devaient être remplies de cellules de levûre.

Les causes d'erreur que je viens d'indiquer sont, comme on le voit, assez nombreuses et assez délicates. Mais il est une manière beaucoup plus simple et beaucoup plus sûre de vérifier l'exactitude de l'assertion de M. Fremy. De ce que nous avons vu sur la cause de la fermentation intracellulaire, il résulte qu'elle doit se produire encore lorsque le fruit est plongé dans un liquide, et en particulier dans un liquide sucré. C'est ce qui a lieu en effet ; M. Fremy a vérifié ce fait lui-même.

« Il résulte de mes essais, dit-il, que dans ces conditions la fermentation intracellulaire se produit peut-être encore avec plus d'énergie que quand les fruits sont plongés dans les gaz. Tout le sucre des fruits disparaît ; les cellules se distendent par le dégagement intérieur d'acide carbonique ; ce gaz détermine ensuite la rupture du tissu cellulaire ; on trouve dans le suc de fruit fermenté de gros grains de ferment ; en un mot, tout démontre que la fermentation s'est produite à l'abri de l'air dans l'intérieur du fruit » (p. 185).

Ainsi, il doit se produire du ferment alcoolique dans tous les fruits plongés dans un liquide sucré. Mais alors ce liquide sucré doit lui-même fermenter, soit directement, parce que les grains de ferment se seront répandus au dehors par la rupture du tissu cellulaire dont parle M. Fremy, soit en broyant les grains, ce qui aura pour effet de mettre sûrement le ferment en contact avec le liquide sucré.

Or, mettons dans un grand nombre de tubes à essai contenant du moût de raisin bouilli *un seul grain de raisin, une seule cerise, une seule fraise, etc.* ; au bout de quelques jours, lorsque la fermentation intracellulaire se sera produite, enlevons le bouchon qui ferme les tubes, écrasons les fruits à l'aide d'une baguette de verre passée dans la flamme (la baguette étant différente pour chacun des tubes), puis remettons le bouchon ; voici ce que l'on constate : dans un grand nombre de tubes, plus des trois quarts, il n'y a pas fermentation

et le liquide reste sucré ; dans les autres, la fermentation se produit.

Voici quelques exemples. Sur vingt-quatre tubes dans chacun desquels j'avais mis un grain de raisin, il n'y eut que trois d'entre eux qui éprouvèrent la fermentation ; dans tous les autres, même après l'écrasement des grains ayant subi la fermentation intracellulaire pendant plus de quinze jours, il ne se forma que des moisissures.

Sur vingt-quatre tubes semblables contenant chacun une fraise bien mûre, il y eut fermentation dans cinq tubes seulement.

Comme, dans la théorie de M. Fremy, *tous* les tubes devraient fermenter, on est obligé de conclure que cette théorie est fausse, et qu'il est inexact de dire que dans la fermentation intracellulaire les cellules du fruit donnent naissance à du ferment alcoolique.

L'expérience précédente est, au contraire, bien facile à expliquer dans la théorie de M. Pasteur. Nous verrons, en effet, qu'il existe des germes de ferment à la surface des fruits sucrés ; mais ces germes ne sont pas tellement répandus qu'ils existent nécessairement à la surface de *tous* les fruits. Si le fruit ou le grain ne porte pas de germes, la fermentation intracellulaire se produira, mais le liquide sucré dans lequel il baigne ne fermentera pas ; si, au contraire, il porte des germes, il y aura à la fois fermentation intracellulaire et fermentation du liquide. Dans ce dernier cas, le liquide fermente souvent avant qu'on écrase le fruit et sans même que la pellicule soit déchirée, ce qui montre bien que les germes sont extérieurs.

On comprend la nécessité de ne mettre *qu'un seul grain* ou *un seul fruit* par tube. Si l'on en mettait plusieurs, on aurait plus de chances d'introduire des germes extérieurs dans tous les tubes, et, la fermentation se produisant dès lors constamment, notre conclusion nous échapperait.

On pourrait à la rigueur placer dans le moût sucré des fruits auxquels on aurait enlevé la pellicule extérieure, par exemple certaines pêches. Dans ce cas, la fermentation intracellulaire se produirait encore, puisque les cellules du fruit ne seraient pas déchirées, mais après l'écrasement aucun des tubes n'entrerait en fermentation.

Si M. Fremy pense que le liquide sucré a pu nuire en quoi que ce soit au développement du ferment organisé, il est facile de répéter l'ex-

périence en mettant *un seul fruit* dans des éprouvettes partiellement remplies d'acide carbonique. On constate alors dans toutes le dégagement d'acide carbonique. On peut attendre aussi longtemps qu'on le veut avant de mettre chacun de ces fruits dans des tubes à moût de raisin bouilli. Après les avoir écrasés avec les précautions nécessaires, on voit que, dans la plupart des cas, la fermentation du moût ne se produit pas. Cette expérience suffit pour prouver que les fermentations intracellulaires ne sont pas du tout corrélatives de la formation de cellules de levûre alcoolique.

Mais il y a plus : nous verrons un procédé qui nous permet d'obtenir des raisins ne portant pas de germes de ferment alcoolique à leur surface; il suffit pour cela de les soustraire aux poussières de l'air pendant qu'ils sont encore verts, jusqu'au moment de leur maturité. On pourra, avec ces raisins, faire éprouver la fermentation intracellulaire à un nombre quelconque de grains, lesquels ne pourront ensuite dans aucun cas provoquer la fermentation alcoolique d'un jus sucré.

Les fermentations intracellulaires, loin de fournir une objection à la théorie générale des fermentations, ne sont donc, comme je l'ai déjà dit, qu'une confirmation précieuse de cette théorie (').

M. Fremy oppose aussi à la théorie de M. Pasteur un autre exemple de fermentation intracellulaire : c'est celle qui a lieu lorsqu'on place des grains d'orge dans de l'eau sucrée.

Voici ce qu'on trouve à cet égard (p. 117) :

« L'orge, lavée à plusieurs reprises avec de l'eau distillée et entièrement débarrassée des poussières qui la recouvrent, a été placée dans de l'eau sucrée et maintenue à une température de 25 degrés.

» Les grains d'orge éprouvent dans ce cas les modifications suivantes : ils ne tardent pas à se gonfler dans l'eau sucrée; on voit sortir de l'intérieur des grains un gaz qui est un mélange d'hydrogène et d'acide carbonique; la liqueur se trouble, elle devient fortement acide et présente tous les caractères des fermentations alcoolique, butyrique, lactique.

(') Voir *Études sur la bière*.

» Le fait capital qui résulte de cette observation, c'est qu'en suivant le phénomène avec attention, *on voit sortir le gaz de l'intérieur même des grains d'orge*. Ce dégagement de gaz rend la liqueur laiteuse ; en l'examinant au microscope, on constate dans le liquide une quantité considérable de ferment lactique, qui s'est formé dans l'intérieur des grains d'orge et qui en a été, en quelque sorte, extrait par les bulles de gaz que les grains dégagent. »

L'explication, d'après M. Fremy, est simple :

« Je rappellerai, dit-il, que le tissu qui constitue le péricarpe du grain d'orge contient de petits globules organisés assez ténus pour passer à travers nos filtres et qui ont à peine $\frac{1}{800}$ de millimètre, d'après Turpin.

» Ces globules sont formés par une substance hémiorganisée vivante qui, au contact de l'air et de l'eau sucrée, se développe et donne naissance alors aux ferments qui déterminent l'altération des grains d'orge (p. 118).

» Dans la théorie de l'hémiorganisme, tous ces faits se comprennent : lorsqu'on place les grains d'orge dans de l'eau sucrée, leur vie aérienne n'est pas possible ; c'est alors que commence, sous l'influence de la force végétative des grains, ce travail de décomposition qui a pour effet de produire les ferments.

» D'après la théorie de M. Pasteur, il faut supposer, pour rendre compte de la fermentation intracellulaire des grains d'orge placés dans de l'eau sucrée, que les germes atmosphériques pénètrent dans le flacon où l'expérience se produit, qu'ils traversent l'eau sucrée et qu'ils s'introduisent dans chaque grain pour s'y développer. Une pareille hypothèse est inadmissible » (p. 120).

Je ferai remarquer qu'on ne peut se débarrasser complètement des poussières qui recouvrent les grains d'orge par des lavages répétés à l'eau distillée. Comment pourrait-il en être ainsi, puisque l'eau distillée, ayant été elle-même au contact de l'air, contient nécessairement des germes ? En second lieu, M. Fremy met les grains dans l'eau sucrée, et il ne dit pas qu'elle ait été privée préalablement de tous les germes qu'elle peut contenir.

Cette expérience ne peut être invoquée en faveur de la théorie de l'hémiorganisme, car on peut répondre que les ferments

qui se développent proviennent des germes qui existent soit à la surface des grains, soit dans l'eau sucrée.

Il est facile de constater que la pâte de farine de blé lève spontanément sous l'influence d'organismes microscopiques lors même que l'eau employée pour le pétrissage a été bouillie. Les germes proviennent donc probablement de la farine. Pour obtenir une farine exempte de germes, je décortique quelques grains de blé, je les flambe rapidement, et je les introduis dans un petit tas d'acier qui a été également flambé. Après les avoir écrasés par le choc, j'obtiens une farine assez grossière qui est mise dans un tube de verre contenant une petite quantité d'eau bouillie. Dans tous les cas, je constate, au bout de deux ou trois jours, un dégagement de gaz et, en même temps, la présence d'organismes microscopiques analogues à ceux qu'on trouve dans la pâte ordinaire. Je pensai, comme les grains étaient assez mal écrasés, que le même fait se produirait encore en ne les écrasant pas du tout. C'est ce qui eut lieu.

Ainsi, des grains de blé flambés mis dans de l'eau bouillie s'altèrent toujours, malgré toutes les précautions que l'on prend pour éviter l'accès des germes de l'air.

J'avoue que je fus un peu surpris de ce résultat. C'est à ce moment que parut la brochure de M. Fremy. Je jugeai, puisque j'avais des altérations avec de l'eau distillée et des grains de blé, qu'il était inutile de m'astreindre à employer de l'eau sucrée et des grains d'orge.

Je pensai alors que, la surface du grain de blé étant rugueuse, il pouvait se faire que, malgré tous mes efforts, il restât des poussières organiques à la surface et en particulier dans la ligne profonde qui sépare, pour ainsi dire, le grain en deux parties. Je pris donc des moitiés de grain que je grattai soigneusement avec un canif; mais le résultat fut le même.

Je me servis de haricots, dont la surface est beaucoup plus lisse; j'enlevais même quelquefois complètement la pellicule extérieure. Malgré cela, l'altération se produisait encore.

Il n'y avait plus, dès lors, qu'une hypothèse possible : les germes existant dans l'eau pouvaient n'être pas tués par une température de 100 degrés maintenue pendant quelques instants. M. Pasteur a démontré, en effet, que les germes de certains organismes ne sont pas

tués dans les milieux neutres ou légèrement alcalins à la température de 100 degrés.

Je pris donc des tubes étirés comme le montre la *fig. 10*. Après les avoir flambés à la lampe d'émailleur, je les laissais refroidir, la partie effilée

Fig. 10.



ournée vers le bas, afin d'éviter autant que possible la rentrée des poussières de l'air; puis j'introduisais une petite quantité d'eau distillée à l'aide d'un entonnoir flambé; je fermais l'effilure à la lampe et je flambais de nouveau les parois qui n'étaient pas en contact avec l'eau⁽¹⁾. Puis tous ces tubes étaient mis dans un bain de chlorure de calcium qu'on chauffait à une température comprise entre 110 et 115 degrés. Le niveau du bain dépassait le niveau de l'eau de 3 ou 4 centimètres. De cette façon, l'eau contenue dans les tubes ne devait plus contenir aucun germe vivant, et, comme les parois avaient été flambées, tout l'intérieur des tubes se trouvait privé de germes.

Pour introduire les grains, qui avaient été choisis aussi sains que possible, on faisait un trait de lime à la partie supérieure du tube et l'on découpait une petite calotte avec un charbon de Berzélius. On enlevait cette calotte tout à côté de la lampe d'émailleur, et immédiatement un aide introduisait un grain tout préparé venant d'être flambé à l'instant; puis on fermait de nouveau le tube à la lampe. Le grain intro-

⁽¹⁾ On peut aussi mettre un petit tampon de coton dans l'effilure, flamber et fermer à la lampe après refroidissement.

duit n'était pas toujours entier; quelquefois il n'y avait qu'une moitié ou un fragment seulement.

Si l'on veut suivre le détail de cette expérience avec attention, on remarquera que toutes les précautions avaient été prises pour éviter l'accès des germes, et cependant dans presque tous les cas il y eut altération; une seule fois sur vingt essais au moins, j'eus un tube avec une moitié de grain ne s'altérant pas.

Que fallait-il conclure? que la théorie de M. Pasteur était fautive et qu'on avait là une preuve rigoureuse de la théorie de l'hémiorganisme? Sans doute les partisans des générations spontanées n'auraient pas manqué de tirer cette conclusion s'ils avaient connu ce résultat. Aucune de leurs expériences n'avait été amenée à ce degré de probabilité.

Mais la théorie de M. Pasteur est si bien établie par tant d'autres faits, qu'il ne me semblait pas possible qu'elle se trouvât en défaut dans ce cas particulier.

Je cherchais une explication; je fus tiré de mon embarras d'une manière bien simple: j'eus l'idée de répéter l'expérience en me servant de grains qui n'avaient pas été au contact de l'air, c'est-à-dire pris au moment même où on les retire de la cosse. Cette fois, je n'eus presque jamais d'altération. Il n'est même plus besoin de passer le grain dans la flamme; il suffit de le prendre dans la cosse qu'on vient d'ouvrir avec une pince flambée et de l'introduire immédiatement dans le tube.

Dans la plupart des cas, l'eau reste claire et limpide; dans quelques autres, il se forme un petit dépôt qui rend l'eau trouble lorsqu'on agite le tube. Ce dépôt, examiné au microscope, est constitué par une matière amorphe ayant une grande analogie avec des débris de cellules. Mais dans aucun cas on ne voit des organismes; de plus, ce dépôt est soluble dans la potasse, tandis que les organismes qui apparaissent dans les tubes altérés ne le sont nullement. Enfin, l'odeur n'est pas du tout la même: celle des tubes altérés est généralement fade et repoussante, tandis que les tubes conservés n'ont aucune mauvaise odeur. Il est très-probable que ce dépôt est formé par la désagrégation de la pellicule du grain.

Il faut avoir soin, dans ces expériences, de ne se servir que de cosses paraissant bien closes et ne portant pas de taches de moisissure à la surface. Malgré ces précautions, il arrive quelquefois que dans un

certain nombre de tubes se développe un mycélium, ce qui tient sans doute à ce que les moisissures qui existent presque toujours à la surface des cosses pénètrent plus ou moins profondément à l'intérieur et arrivent jusque sur les grains qu'elles renferment. Mais il ne faut pas confondre ces moisissures, qui ne se produisent d'ailleurs que dans quelques cas très-rares, avec les altérations dont parle M. Fremy, altérations dans lesquelles il se produit de véritables ferments qui n'ont aucune relation avec les moisissures.

Ainsi nous arrivons à ce résultat : si l'on prend des grains de haricot sortant de leurs cosses et qu'on les introduise, en prenant les précautions convenables, dans de l'eau distillée qui a été préalablement portée à 110 ou 115 degrés, il n'y a pas d'altération; si, au contraire, on se sert de grains de haricots du commerce, il y a presque toujours production de ferments.

J'ai répété l'expérience en plaçant les grains, non dans de l'eau distillée pure, mais dans de l'eau sucrée, afin de savoir si le sucre jouait un rôle actif et pour me placer dans les mêmes conditions que M. Fremy; le résultat fut exactement le même. Il faut en conclure que le sucre est une complication tout à fait inutile de l'expérience.

Après avoir obtenu des résultats si nets avec les grains de haricots, j'ai essayé les grains de blé et les grains d'orge. Avec les grains de blé, l'expérience réussit encore, mais plus rarement; cela tient à ce que les grains de blé ne sont pas aussi bien clos que les grains de haricots. En effet, les glumes qui enferment le grain de blé ne sont pour ainsi dire que juxtaposées l'une contre l'autre; il arrive même souvent qu'elles s'entr'ouvrent; dès lors, on comprend que les poussières de l'air puissent pénétrer jusqu'au grain, surtout par les gouttes de pluie qui les entraînent.

Avec les grains d'orge, l'expérience est pour ainsi dire impossible. En effet, ces grains ne sont plus enfermés dans une cavité qui les protège contre les poussières de l'air; les glumes n'existent pas, ou, si elles existent, elles sont collées sur le grain de façon à former un tout avec lui. De plus, la surface extérieure du grain d'orge est rugueuse, remplie de cavités dans lesquelles se déposent les poussières. Le grain d'orge est donc dans les conditions les plus défavorables pour qu'on puisse le conserver en le mettant dans l'eau privée de germes. Aussi

n'ai-je pas réussi à obtenir des tubes de grains d'orge ordinaire ne s'altérant pas. Mais j'ai trouvé une variété d'orge où les grains se trouvent enfermés à peu près de la même façon que les grains de blé. Avec cette variété, le résultat a été identique à celui du blé : dans un grand nombre de tubes il n'y eut aucune altération.

Dans toutes les expériences précédentes, les tubes dans lesquels se trouvent les grains sont complètement fermés. J'ai opéré ainsi, afin d'éviter autant que possible les causes d'erreur provenant des germes répandus dans l'air ; mais j'ai constaté depuis que ces germes ne sont pas à redouter autant que je le pensais. J'ai pu alors répéter ces expériences d'une manière très-simple, de façon que l'air intérieur soit constamment en communication avec l'air extérieur.

On prend des tubes à essai bien propres que l'on bouche avec des tampons de coton ; on les flambe dans un fourneau à gaz. A l'aide d'une pipette flambée portant un tampon de coton à sa partie supérieure, en *a* (*fig. 11*), on aspire l'eau distillée ou l'eau sucrée ayant été portée

Fig. 11.



à la température de 110 ou 115 degrés, et l'on en introduit une petite quantité dans chacun des tubes, qu'on referme immédiatement à l'aide des tampons de coton ; puis on prend les grains dans les cosses ou sur les épis à l'aide d'une pince flambée et on les laisse tomber dans les tubes. Ces grains se conservent ainsi parfaitement dans presque tous les cas, quelle que soit la température à laquelle on les porte.

On peut employer des bouchons de liège pour fermer les tubes, mais la communication avec l'air n'est pas aussi facile, et, de plus, les bouchons se dessèchent au bout d'un certain temps. Les tampons de coton me paraissent préférables pour éviter la rentrée ultérieure des germes par suite des variations de température.

Fermentation du jus de raisin.

On sait en quoi consiste cette fermentation : des raisins écrasés, abandonnés au contact de l'air à une température de 20 à 25 degrés, ne tardent pas à se remplir de cellules de levûre qui font fermenter le liquide sucré.

D'après M. Pasteur, ces cellules proviennent de germes existant dans l'air ou à la surface des grains et de la grappe.

M. Fremy leur donne une origine toute différente (p. 156) :

« Selon moi, dit-il, c'est le raisin lui-même qui produit sa levûre et il ne l'emprunte jamais à l'atmosphère.

» Dans cette théorie, ajoute M. Fremy, le ferment alcoolique du raisin a deux origines : il peut provenir soit de la pulpe, soit du suc du fruit.

» Lorsqu'on détache du grain de raisin la pellicule qui le recouvre, on trouve dans les cellules épidermiques du fruit une quantité innombrable de petits granules organisés qui, au contact de l'air, se transforment en ferment alcoolique du raisin.

» Le suc du fruit peut également produire du ferment à la manière du moût d'orge et de l'eau de levûre sucrée.

» Ce suc filtré ne présente, il est vrai, aucun corpuscule organisé, mais il contient une substance plasmatique vivante qui, en s'organisant au contact de l'air, peut engendrer le ferment alcoolique (1). »

(1) Remarquons que M. Fremy fait jouer à l'oxygène deux rôles différents ; ainsi, dans la fermentation ordinaire du raisin et dans l'expérience de Gay-Lussac que nous verrons plus loin, l'oxygène est indispensable à la matière albuminoïde pour produire le ferment, tandis que, dans l'expérience des fruits sucrés plongés dans le gaz acide carbonique, l'absence complète d'oxygène est nécessaire à la production du même ferment.

M. Fremy ajoute que la fermentation du jus de raisin se comprend très-facilement de cette manière, tandis qu'elle devient inexplicable dans la théorie de M. Pasteur.

Introduisons au moment des vendanges, c'est-à-dire au moment le plus favorable pour la fermentation, des grains de raisin bien mûrs dans une série de tubes flambés fermés par un tampon de coton, comme ceux que j'ai décrits tout à l'heure, en ayant soin de ne mettre qu'un seul grain par tube et de prendre ces grains sur des grappes saines, en laissant à chaque grain le plus petit fragment de grappe possible; écrasons les grains avec des agitateurs flambés. Voici ce que l'on constate :

Dans un grand nombre de tubes, souvent plus des trois quarts, il ne se produit aucune fermentation. Ce fait, découvert par M. Pasteur, est impossible à expliquer dans la théorie de l'hémiorganisme, car la matière hémiorganisée est la même pour tous les grains de raisin et elle est placée dans des conditions identiques; par conséquent, *tous* les tubes devraient entrer en fermentation, ce qui n'a jamais lieu.

M. Pasteur a voulu aller plus loin. Au moyen d'une disposition très-ingénieuse, il a pris une goutte de liquide à l'intérieur d'un grain, et, en mélangeant cette goutte à du moût de raisin bouilli, il a montré qu'il n'y avait *jamais* fermentation. Mais, outre que cette expérience est fort délicate, on pourrait dire que dans la goutte prise par M. Pasteur ne se trouvent pas les cellules devant engendrer le ferment; par exemple, on aurait pu soutenir que ce sont les cellules placées immédiatement au-dessous de la pellicule qui produisent le ferment; or ces cellules, d'après la disposition adoptée par M. Pasteur, peuvent ne pas exister dans la goutte puisée à l'intérieur du grain. M. Fremy a essayé de prouver aussi que les petites quantités ne fermentent pas, ce qui est inexact, comme l'a montré M. Pasteur; il vaut mieux éviter toutes ces objections qui entraînent beaucoup trop loin, et, sous ce rapport, l'expérience précédente est tout à fait concluante.

D'ailleurs, en se servant des raisins ne portant pas de germes dont j'ai déjà parlé, on peut écraser des raisins entiers dans des appareils privés de germes et il ne se produit jamais de fermentation, ce qui montre bien le peu de fondement de la théorie de l'hémiorganisme.

M. Fremy trouve aussi que de tous les éléments du grain de raisin le suc trouble est celui qui fermente avec le plus de rapidité, que, après plusieurs filtrations, le moût perd ses facultés fermentescibles à mesure qu'il devient plus limpide, et qu'un suc absolument clair peut être conservé beaucoup plus longtemps sans éprouver de fermentation qu'un moût trouble. Cependant le moût clair n'a pas perdu la propriété de fermenter.

« Pourquoi le suc de raisin éclairci par des filtrations répétées au contact de l'air, et saturé par conséquent de germes atmosphériques, fermente-t-il beaucoup plus difficilement que le suc trouble qui sort des grains de raisin » (p. 164)?

La réponse est bien simple. Le moût trouble, tel qu'on l'obtient en comprimant des grains écrasés dans un linge, fermente avec la plus grande facilité parce qu'il contient presque tous les germes qui existaient à la surface des grains et de la grappe; lorsqu'on filtre, ce suc, au contraire, une grande partie des germes reste sur le filtre où il se forme un dépôt de substance albumineuse qui bouche les pores; à chaque filtration, une certaine quantité des germes est ainsi enlevée et, par suite, le moût clair doit fermenter moins rapidement. Quant à l'objection tirée de ce que le moût clair, ayant filtré pendant plusieurs heures, devrait être saturé de germes atmosphériques, elle est sans valeur depuis que nous savons que les germes de ferment alcoolique sont en réalité peu abondants dans l'air. C'est surtout, et presque exclusivement, par les germes qui existent à la surface de la grappe ou du grain que le moût de raisin entre en fermentation.

Arrivons maintenant à l'expérience de Gay-Lussac qui, d'après M. Fremy, « constitue certainement une des objections les plus graves que l'on puisse opposer aux théories de M. Pasteur » (p. 168).

Gay-Lussac écrase des grains de raisin dans une éprouvette pleine de mercure, après les avoir lavés avec du gaz hydrogène pour chasser, autant que possible, l'air adhérent aux grains et aux parois de l'éprouvette. La fermentation ne se produit pas. Au bout de plusieurs semaines, Gay-Lussac fait passer quelques bulles d'oxygène dans l'éprouvette, et la fermentation commence les jours suivants. Il en conclut que « la

fermentation du moût de raisin ne peut commencer sans le secours du gaz oxygène » (1).

L'expérience de Gay-Lussac est parfaitement exacte. Les grains de raisin ainsi écrasés peuvent être conservés indéfiniment sans manifester le moindre signe de fermentation, mais celle-ci se produit généralement si l'on introduit d'une manière quelconque quelques centimètres cubes de gaz oxygène. M. Fremy interprète ce résultat en disant que l'oxygène a permis à la matière albuminoïde du grain de raisin de s'organiser et de produire des cellules de ferment alcoolique.

M. Pasteur, au commencement de ses études sur les fermentations, pensait que l'introduction de l'air avait eu nécessairement pour effet d'amener des germes au contact des grains écrasés, et, suivant lui, ces germes devaient se trouver, soit dans la petite quantité d'air introduite, soit dans le mercure, soit enfin sur les parois de l'éprouvette. Mais nous savons maintenant que les germes de ferment alcoolique sont peu répandus dans l'air; nous ne pouvons donc pas admettre qu'il y en ait eu souvent dans les 2 ou 3 centimètres cubes d'oxygène introduits. D'ailleurs, M. Fremy a dégagé directement l'oxygène au moyen de la pile au sommet de l'éprouvette, et la fermentation a eu lieu. L'hypothèse d'après laquelle les germes se trouveraient dans le mercure ou sur les parois de l'éprouvette est possible; il est certain que, dans un laboratoire où l'on travaille constamment sur les fermentations, il y a des germes dans la cuve à mercure, il peut y en avoir aussi sur les parois de l'éprouvette, mais ce n'est pas là toujours la véritable cause de la fermentation. En effet, on peut préalablement flamber l'éprouvette, chauffer le mercure à une température suffisante pour tuer tous les germes, faire passer ensuite de l'oxygène exempt de germes, et cependant la fermentation se produira encore. Les différentes causes indiquées autrefois par M. Pasteur pouvaient donc être des causes accidentelles, mais n'étaient assurément pas la cause essentielle. Ce n'est que depuis quelques années, depuis qu'il a découvert l'existence des germes à la surface des grains de raisin, et surtout depuis qu'il a établi la véritable théorie de la fer-

(1) GAY-LUSSAC, *Annales de Chimie*, t. LXXVI, p. 245.

mentation, que M. Pasteur a pu donner la cause exacte du fait observé par Gay-Lussac.

M. Pasteur, dans ses *Études sur la bière*, montre que les *vieilles cellules* de levûre ne peuvent se rajeunir et jouer leur rôle de ferment qu'autant que les milieux sucrés dans lesquels on les place contiennent de l'oxygène en dissolution. Si le milieu sucré est privé d'oxygène, la levûre reste inerte. Or, les germes qui existent à la surface des grains de raisin sont précisément dans un état comparable à celui des cellules vieilles dont je viens de parler; par conséquent ils restent stériles lors même qu'ils sont en contact avec le moût de raisin. Ils ne peuvent bourgeonner et produire la fermentation que lorsqu'on a introduit de l'oxygène.

Au lieu de mettre plusieurs grains dans une éprouvette pleine de mercure comme le fait Gay-Lussac, mettons *un seul grain* de raisin et écrasons-le. Préparons ainsi vingt éprouvettes, par exemple, et, après avoir constaté que la fermentation n'a pas lieu, faisons passer dans toutes, avec les précautions nécessaires, quelques centimètres cubes d'oxygène. Nous observerons que quelques éprouvettes, quatre ou cinq peut-être, entreront en fermentation, mais toutes les autres resteront dans le même état que si l'on n'avait pas fait passer d'oxygène (¹). Le nombre des éprouvettes qui fermenteront pourra varier, mais dans toutes les séries d'expériences il y aura toujours des éprouvettes ne fermentant pas.

Il est impossible d'expliquer ce résultat dans la théorie de l'hémi-organisme. La matière albuminoïde du grain de raisin au contact de l'oxygène ne saurait produire de la levûre dans quelques cas seulement, puisque les conditions sont exactement les mêmes.

Avec M. Pasteur, au contraire, l'explication est très-simple. Les germes sont inégalement répandus sur les grains de raisin, et un certain nombre d'entre eux n'en portent pas. Ces derniers ne doivent donc pas fermenter, lors même qu'ils se trouvent en présence de l'oxygène. En se servant de raisins qui ne portent pas de germes et qu'il est facile

(¹) Je ne parle pas des moisissures qui pourront se développer; elles n'ont rien de commun avec le ferment alcoolique.

de se procurer, la fermentation ne se produirait dans aucun cas, ce qui est exactement le contraire de l'expérience de Gay-Lussac. Je ferai remarquer d'ailleurs que Gay-Lussac fit deux expériences et qu'il n'y eut fermentation que dans un cas.

A propos de l'expérience de Gay-Lussac, je trouve les assertions suivantes :

1° Du suc de raisin filtré à l'air, introduit dans des tubes bouchés et renversés sur la cuve à mercure, n'entre pas en fermentation.

2° Ce suc fermente si l'on introduit dans le tube une petite quantité d'oxygène.

3° Les résultats sont les mêmes si l'on opère avec du moût trouble, tel qu'on l'obtient en pressant la grappe dans un linge.

« Tous ces faits, ajoute M. Fremy, démontrent clairement que la génération des ferments est due à la vitalité des liquides organiques, entretenue par l'oxygène, et nullement à l'influence des prétendus germes atmosphériques de ferments » (p. 176).

Voici quelques expériences contradictoires :

Le 20 novembre 1876, des raisins bien conservés sont écrasés et comprimés dans un linge. Le jus trouble obtenu est mis dans deux tubes flambés et renversés ensuite sur le mercure. Au bout de deux jours, ces deux tubes fermentent activement par la levûre apiculée.

Le même jour, une autre partie du moût trouble ayant été filtrée, le liquide clair obtenu a été mis dans quatre tubes flambés qui ont été aussi renversés sur le mercure. Les jours suivants, il ne se déclare aucune fermentation ; il se précipite seulement dans le liquide une matière brunâtre et mucilagineuse. Cependant, vers le 8 décembre, on voit une quantité notable de gaz au haut de deux des tubes ; la fermentation a donc commencé, mais seulement quinze jours environ après la mise en expérience. De plus, le dégagement du gaz est très-lent. Le 14 décembre, un des tubes est presque rempli d'acide carbonique ; la levûre, examinée au microscope, montre des cellules ovales un peu allongées, remplies de granulations intérieures ; les parois sont épaissies comme dans les vieilles cellules de levûre ; on ne rencontre que très-peu de cellules jeunes, à protoplasma transparent. Le second tube

fermente encore plus lentement. Le 20 décembre, il n'y a encore que 7 ou 8 centimètres cubes de gaz dégagé ; la levûre, examinée ce jour-là, est semblable à la précédente.

Quant aux deux autres tubes, ils n'ont pas donné de fermentation.

Il faut conclure de cette expérience : 1° qu'il n'est pas exact de dire que des tubes de moût trouble placés sur le mercure n'entrent jamais en fermentation ; 2° que le moût clair, placé dans des tubes sur le mercure, peut aussi fermenter, quoique moins activement.

L'explication de ces résultats est d'ailleurs facile.

Le moût trouble renferme beaucoup de germes et contient de l'oxygène en dissolution ; les germes peuvent donc bourgeonner rapidement, et, comme les cellules nouvelles ont été formées sous l'influence de l'oxygène, elles ont une grande vitalité et décomposent le sucre rapidement.

Dans le moût filtré, les germes sont en quantité beaucoup plus petite ; il y a donc moins de probabilité pour qu'il se trouve des cellules-germes très-actives. Alors, une partie de l'oxygène dissous se combine au moût pour l'oxyder et probablement donner naissance à cette matière brunâtre qui se dépose assez vite. Les bourgeons issus des cellules-germes, ayant été formés sous l'influence d'une petite quantité d'oxygène, ont peu de vitalité, et, par suite, la décomposition du sucre est très-lente : c'est ce qui a eu lieu pour deux des tubes.

Il peut même se faire que tout l'oxygène dissous disparaisse par oxydation du moût avant que le bourgeonnement soit possible ; dès lors, aucune fermentation ne peut se manifester : c'est ce qui a eu lieu pour les deux autres tubes.

Si ce raisonnement est exact, le nombre des tubes qui éprouvent la fermentation doit diminuer lorsque le moût a été obtenu avec des raisins conservés pendant très-longtemps, car on sait que la quantité des germes féconds qui existent sur les raisins diminue avec le temps.

C'est ce que l'expérience m'a montré d'une façon très-nette, en me servant de moût préparé avec des raisins blancs très-bien conservés, par la méthode de Thommery, depuis la dernière récolte jusqu'à la fin

du mois de janvier. Avec ce moût j'ai fait dix tubes que j'ai placés sur le mercure, savoir :

- 2 de moût trouble saturé d'air, et 2 du même moût non saturé;
- 3 de moût clair saturé d'air, et 3 du même moût non saturé.

La fermentation eut lieu dans les deux tubes de moût trouble saturé d'air, dans un tube du même moût non saturé et dans un tube de moût clair non saturé, mais dans ce dernier il n'y eut qu'un commencement de fermentation; il ne se dégagait que 4 ou 5 centimètres cubes de gaz acide carbonique, après quoi le volume resta stationnaire.

En résumé, le fait que du moût de raisin trouble ou filtré mis dans des tubes placés sur le mercure ne fermente pas n'est donc pas rigoureusement exact. Les résultats varient et s'expliquent par les conditions des expériences, et même, d'après ce qu'on vient de voir, si l'on se servait de raisins pris à la vigne au moment des vendanges, c'est-à-dire au moment où il y a le plus de germes féconds, il est probable qu'on aurait dans presque tous les cas la fermentation avec le moût trouble et le plus souvent avec le moût clair.

Un autre résultat de mes expériences est plus net encore. M. Fremy dit que, lorsque du moût de raisin placé dans un tube sur le mercure n'a pas fermenté, l'introduction d'une petite quantité d'oxygène provoque la fermentation au bout de quelques jours; cet oxygène permet à la matière hémiorganisée du moût de raisin de donner naissance aux cellules de levûre. Comment expliquer alors qu'il y ait des cas où la présence de l'oxygène ne produise aucun effet? Voici des exemples :

Le 4 janvier, je fais passer, avec les précautions convenables, 3 ou 4 centimètres cubes d'air dans un tube de moût de raisin filtré placé sur le mercure depuis le 20 décembre et qui n'avait donné aucune fermentation. Les jours suivants, le volume du gaz ne varie pas, et pendant plusieurs mois les choses sont restées dans le même état.

Le 10 mars, je fais de même passer quelques centimètres cubes d'air dans quatre tubes de moût de raisin. Trois avaient été préparés le 20 décembre et le quatrième le 7 décembre. Aucun de ces tubes n'a fermenté.

La présence de l'oxygène ne suffit donc pas dans tous les cas pour produire la fermentation.

Il peut même arriver que l'introduction de l'air produise un commencement de fermentation qui s'arrête ensuite. C'est ce que j'ai observé dans deux cas.

Le 1^{er} décembre, je fais passer 3 ou 4 centimètres cubes d'air dans un tube de moût placé sur le mercure depuis le 11 novembre. Au bout de trois ou quatre jours, le volume du gaz a sensiblement doublé; mais à partir de ce moment il est resté invariable. L'examen microscopique de ce tube, qui a eu lieu le 4 janvier, montre des cellules petites et ovales de levûre vieillie.

Le 27 février, j'ai répété la même expérience sur un tube de moût filtré du 29 janvier. Il y eut aussi un commencement de fermentation qui s'arrêta au bout de quatre ou cinq jours. La levûre était analogue à la précédente.

Ces différents résultats sont incompatibles avec la théorie de l'hémi-organisme, tandis qu'ils se comprennent très-bien dans la théorie des germes. Les différentes quantités d'un même moût peuvent en effet, après leur filtration, renfermer des germes en quantité variable, en être privées complètement ou ne renfermer que des germes inféconds. Dans ce dernier cas, la présence de l'oxygène ne pourra jamais provoquer la fermentation.

Fermentation du lait.

Les études faites par M. Fremy sur la fermentation du lait l'ont conduit à opposer à la théorie de M. Pasteur les arguments suivants (p. 152):

« 1^o Le lait, soumis à la température qui tue tous les ferments, éprouve encore plusieurs espèces de fermentations.

» 2^o Le lait qui sort du pis de la vache et qui tombe dans un flacon contenant de l'air privé de germes fermente toujours.

» 3^o En faisant varier la réaction du lait, en le rendant neutre, alcalin ou acide, on peut lui faire éprouver à volonté des fermentations différentes.

» Tous ces faits me paraissent inexplicables dans la théorie de M. Pasteur et confirment, au contraire, les idées que j'ai émises sur la génération des ferments par les liquides organiques vivants. »

Examinons chacune de ces affirmations.

« 1° Le lait, soumis à la température *qui tue tous les ferments*, éprouve encore plusieurs espèces de fermentations. »

Si ce fait était prouvé, il serait suffisant pour renverser la théorie de M. Pasteur, car on aurait un exemple d'un liquide organique donnant naissance spontanément à des ferments sans qu'il y ait de germes préexistants.

Le point délicat est de savoir si, dans ses expériences, M. Fremy a atteint réellement la température *qui tue tous les ferments*. Son expérience consiste à faire bouillir du lait pendant quelques instants, en prenant les précautions nécessaires pour empêcher l'introduction des germes par la rentrée de l'air. Il constate néanmoins que le liquide s'altère. Ce fait n'est pas nouveau ; il avait été annoncé dès 1862 par M. Pasteur. Seulement M. Pasteur, loin d'en tirer les mêmes conclusions, l'explique en disant que l'ébullition du lait est insuffisante pour tuer les germes qui y existent, tandis que M. Fremy admet que cette ébullition suffit. « Je n'admets pas, dit-il, qu'un organisme albumineux puisse rester vivant dans l'eau bouillante » (p. 151). Mais on ne trouve nulle part de preuves de cette affirmation. M. Fremy a bien constaté que l'albumine en dissolution dans l'eau est coagulée et tuée au-dessous de 100 degrés, mais peut-on comparer l'albumine *en dissolution dans l'eau* avec des germes d'organismes qui échappent à notre investigation ?

M. Pasteur avait démontré que l'ébullition du lait est insuffisante pour tuer les germes qu'il peut renfermer en portant ce liquide à une température plus élevée, à 110 degrés par exemple ; dans ce cas, il n'y a plus d'altération. On constate une faible oxydation directe de la matière grasse, mais jamais on ne voit apparaître d'organismes microscopiques. Ainsi le lait, porté à la température d'environ 100 degrés, s'altère en donnant naissance à des organismes microscopiques ; mais, si la température est portée à 110 degrés, il n'y a plus d'altération.

M. Fremy interprète ce résultat en disant que, par l'effet d'une température de 110 degrés, le caséum du lait a été tué, tandis qu'il ne l'é-

tait pas par une ébullition de quelques instants à 100 degrés. Or, pour M. Fremy, c'est précisément ce caséum qui, continuant à vivre, donne naissance aux organismes qui se développent dans le lait bouilli. Cette interprétation pourrait être admise jusqu'à un certain point si les expériences de M. Pasteur n'avaient porté que sur le lait ; mais il a démontré que le fait de l'altération après l'ébullition n'était pas particulier au lait, et qu'il avait lieu pour les liquides qui, comme le lait, ont une réaction légèrement alcaline au moment de l'ébullition. Pour cela, il ajoute du carbonate de chaux à de l'eau de levûre acide ; il a ainsi un liquide sensiblement neutre, et dans ce cas l'ébullition pendant quelques minutes ne suffit plus pour le stériliser, tandis qu'elle suffisait avant l'addition du carbonate de chaux. On ne peut pas dire que les germes ont été apportés par le carbonate de chaux, car on peut préalablement le porter à la chaleur rouge, et l'altération a lieu de la même façon. Pour stériliser le mélange d'eau de levûre et de carbonate de chaux, il faut le porter à la température de 110 degrés environ.

Dans ce cas particulier, il n'y a plus de caséum ; la matière albuminoïde est restée la même dans les deux expériences ; et cependant, dans un cas, lorsque le liquide est acide, les germes sont tués, dans l'autre, lorsque le liquide est légèrement alcalin, ils ne le sont plus par une même ébullition de quelques instants. Il faut donc bien admettre que les germes ont résisté à la température de 100 degrés par ce seul fait qu'ils se trouvaient dans un milieu neutre ou légèrement alcalin. Nous verrons d'ailleurs, à la fin de ce travail, que tous les liquides neutres ou alcalins se comportent de même, et que l'eau en particulier renferme souvent encore des germes actifs, même après qu'elle a été portée pendant plus d'une heure à la température de 100 degrés. Il est donc inexact de dire que la température de 100 degrés tue tous les ferments.

Voyons maintenant la deuxième affirmation.

« 2° Le lait qui sort du pis de la vache et qui tombe dans un flacon contenant de l'air privé de germes fermente toujours. »

Je dois faire remarquer d'abord que, lors même que ce fait serait vrai, il n'infirmerait en rien la théorie de M. Pasteur, car il serait pos-

sible que des organismes extérieurs pénétrassent plus ou moins profondément dans le pis de la vache et fussent entraînés avec le lait que l'on recueille. Mais M. Pasteur, après avoir constaté que le sang et l'urine d'un animal sain sont exempts d'organismes, avait été amené à conclure qu'il devait en être de même pour le lait; aussi avait-il annoncé que du lait extrait directement du pis de la vache et recueilli dans un vase privé de germes *devait* se conserver indéfiniment sans la moindre production d'organismes microscopiques. M. Pasteur fit même plusieurs essais, mais il n'eut pas le temps de les continuer.

Voici les expériences de M. Fremy (p. 146) :

« Cinq ballons de verre à col effilé ont été nettoyés avec le plus grand soin; j'ai introduit dans leur intérieur une petite quantité d'eau qui a été portée à l'ébullition; j'ai fermé ensuite à la lampe le col effilé des ballons; j'avais donc ainsi à ma disposition des ballons de verre ne contenant plus intérieurement de germes atmosphériques.

» Ces ballons ont été transportés dans une étable; j'ai entouré la pointe des ballons d'une grande quantité de coton, destiné à arrêter les poussières de l'air qui pouvaient rentrer dans les ballons, au moment de leur ouverture; j'ai ensuite brisé la pointe des ballons qui se sont remplis d'air privé de germes. J'ai introduit dans ces ballons le lait sortant du pis de la vache; les ballons ont été ensuite fermés avec soin, puis conservés dans mon laboratoire à la température de 20 degrés environ.

» Au bout de quelques jours, la fermentation s'est produite dans tous ces ballons; le caséum s'est d'abord coagulé; le liquide est devenu ensuite fortement acide; il contenait de l'acide lactique et de l'acide butyrique. Sur les cinq ballons préparés, trois ont fait explosion à la suite de la quantité considérable de gaz que le lait avait dégagé. »

M. Fremy conclut de là que c'est le développement organique du caséum qui a produit les différents ferments.

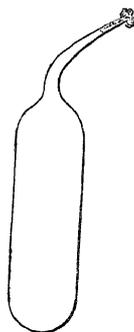
Cette expérience semble rigoureuse au premier abord, et l'on est tenté de tirer la même conclusion.

Et cependant il y a une cause d'erreur considérable, qui est telle, qu'il n'était pas possible d'obtenir du lait se conservant sans production d'organismes par cette méthode. Nous verrons, en effet, que l'ébullition

de l'eau dans des ballons, même pendant une heure, ne suffit pas le plus souvent à priver ces ballons de germes. Or, M. Fremy a fait bouillir l'eau pendant quelques instants seulement; les ballons n'étaient donc pas privés de germes, et ce sont ces derniers qui se sont surtout développés dans le lait.

Pour démontrer ce fait, j'ai pris des tubes un peu étirés et recourbés, comme le montre la *fig. 12*; j'ai placé à l'extrémité de chacun d'eux

Fig. 12.



un tampon de coton et je les ai flambés dans un fourneau à gaz. Les tubes sont retirés lorsque le coton a pris une teinte jaunâtre; tous les germes sont alors détruits. Après refroidissement, j'ai enlevé le tampon de coton, flambé à la lampe à alcool la pointe étirée et introduit le lait directement, en approchant la pointe aussi près que possible du pis. Le tube est incliné vers le bas jusqu'au moment de recevoir le lait, afin d'éviter la chute des poussières de l'air. On ferme ensuite les tubes à la lampe et on les porte à l'étuve à 25 degrés.

Généralement, au bout d'une huitaine de jours, on s'aperçoit que le lait est altéré dans quelques tubes; le liquide est séparé en deux couches, la couche inférieure blanche et la couche supérieure incolore. En ouvrant ces tubes, je n'ai jamais constaté de dégagement de gaz, mais le lait est devenu acide; au microscope, on voit des bâtonnets immobiles et souvent aussi du ferment lactique. Au goût, le lait est manifestement altéré. Mais dans beaucoup d'autres

tubes (9 sur 12 dans une de mes expériences) le lait reste tout à fait intact et fluide comme lorsqu'il vient d'être trait; il est très-légèrement alcalin au papier de tournesol, bon au goût, et au microscope on ne peut constater la présence d'aucun organisme. J'ai gardé ainsi du lait *pendant plusieurs mois* sans voir apparaître le moindre organisme microscopique. Plusieurs savants attachés au laboratoire de M. Pasteur, et M. Pasteur lui-même, ont examiné ce lait à différentes reprises et l'ont trouvé très-bien conservé.

Ces expériences ont été faites surtout avec des chèvres qu'on amenait au laboratoire, de manière à éviter les germes qui existent dans les étables. Il était aussi plus facile de prendre toutes les petites précautions pour ainsi dire indispensables à la réussite d'expériences aussi délicates. La chèvre a, d'ailleurs, d'autres avantages sur la vache : le pis est lisse, de sorte que les poussières et les saletés qui doivent pulluler d'organismes sur le pis de la vache n'existent pas, ou presque pas, sur celui de la chèvre; enfin, le canal du pis étant ordinairement très-étroit chez les chèvres, on a moins de chances pour que les organismes extérieurs puissent y pénétrer. Pour plus de sûreté, il est bon de rejeter les premières portions de lait.

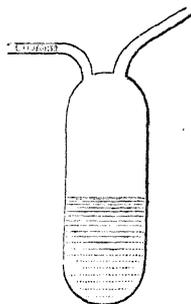
Malgré toutes ces précautions, il y a presque toujours quelques tubes qui s'altèrent. La cause doit en être attribuée aux germes qui existent dans l'air, sur le pis, les poils de l'animal, etc.

Les tubes dont je viens de parler avaient été fermés à la lampe aussitôt après l'introduction du lait; par conséquent, le liquide se trouvait en présence d'une quantité d'air limitée. On pourrait objecter, comme l'a fait M. Fremy pour le sang et l'urine, que l'oxygène est rapidement absorbé et que, dès lors, les organismes microscopiques ne peuvent plus prendre naissance. Je pourrais répondre à mon tour qu'on ne comprend plus alors comment il se fait que tous les tubes qui renferment les mêmes quantités d'air et de liquide ne se conservent pas ou ne s'altèrent pas ensemble. Pourquoi la conservation dans certains cas et l'altération dans d'autres? Enfin, pourquoi y a-t-il toujours altération lorsqu'on met du lait, sans précautions particulières, en présence d'une très-petite quantité d'air?

Pour mieux porter la conviction dans l'esprit de ceux qui pourraient conserver des doutes, j'ai ajouté au tube devant recevoir le lait un

petit tube de verre recourbé (*fig. 13*) renfermant un tampon de coton roussi, de telle façon que, par l'intermédiaire de ce tube, il y avait constamment communication entre l'air du tube et l'air extérieur. Les résultats ont été absolument les mêmes qu'avec les tubes fermés. Il serait même facile d'imaginer un dispositif permettant de faire passer un courant d'air pur continu dans le tube, comme je l'ai fait pour l'urine. La conclusion ne saurait être douteuse.

Fig. 13.



Ainsi M. Pasteur avait parfaitement raison. Le lait sortant du pis de la vache et recueilli dans un vase privé de germes se conserve indéfiniment au contact d'un air pur. Si jusqu'ici on n'était pas arrivé à ce résultat, il faut surtout en attribuer la cause à ce que les vases dans lesquels on recueillait le lait n'étaient pas complètement privés de germes, l'ébullition de l'eau dans un ballon pendant quelques instants ne suffisant pas pour tuer tous les germes qui y existent ⁽¹⁾.

Je viens de dire que par cette méthode il y a toujours quelques tubes qui s'altèrent. J'ai cherché à modifier l'expérience de façon à avoir pour ainsi dire sûrement des tubes de lait se conservant indéfiniment.

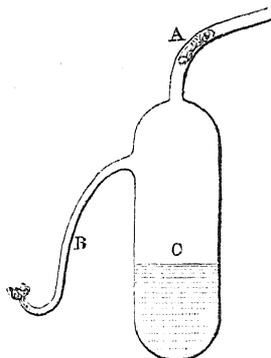
J'avais pensé arriver à ce résultat en allant chercher le lait dans le pis lui-même, de façon qu'il n'ait pas du tout le contact des poussières de l'air.

Pour cela, j'ai préparé des tubes à peu près analogues à ceux dont j'ai parlé pour la conservation du sang; ils sont représentés par la *fig. 14*;

⁽¹⁾ J'ai lu récemment que le D^r Lister était aussi parvenu à conserver du lait naturel en le recueillant dans des vases flambés.

le petit tube A renferme un tampon de coton, et l'extrémité effilée et recourbée du tube B est coiffée aussi d'un tampon de coton. On flambe ces tubes dans le fourneau à gaz. Au moment de s'en servir, on enlève la coiffe de coton et l'on introduit l'extrémité recourbée dans le pis; on aspire par le tube A, à l'aide d'un tuyau de caoutchouc; le lait arrive alors en C. On retire la pointe, on chasse le lait restant dans le tube et l'on ferme ce dernier à la lampe. Les tubes sont ensuite portés à l'étuve.

Fig. 14.



Je dois dire que la proportion des tubes s'altérant n'a pas été plus faible que par l'autre méthode. Cela tient probablement à ce que, au moment de l'introduction du tube effilé dans le pis, il y a toujours un petit tâtonnement, de sorte que l'orifice se trouve plus ou moins en contact avec les parties extérieures du pis sur lequel se trouvent des germes qui peuvent pénétrer dans le petit tube et être entraînés avec le lait. De plus, le canal du pis doit être assez large pour pouvoir introduire le tube de verre; cette condition est défavorable, parce que les organismes peuvent alors y pénétrer beaucoup plus facilement⁽¹⁾.

Quoi qu'il en soit, par une méthode ou par une autre, on a toujours un certain nombre de tubes dans lesquels le lait naturel reste parfaitement intact en présence d'un air pur. Cela suffit pour démontrer que

(¹) Je pense que le meilleur procédé consisterait à recueillir le lait d'une vache venant d'être abattue; pour cela on couperait le pis avec un scalpel flambé, et l'on aspirerait le liquide dans des tubes analogues à ceux que j'ai décrits pour la conservation du sang.

les organismes qui se développent dans le lait ne sont pas produits par le liquide lui-même.

J'arrive enfin à la troisième objection de M. Fremy, savoir :

« 3° En faisant varier la réaction du lait, en le rendant neutre, alcalin ou acide, on peut lui faire éprouver à volonté des fermentations différentes. »

J'em'empresse d'ajouter que je suis tout à fait d'accord avec M. Fremy sur ce point particulier. Aussi je ne comprends pas en quoi ce fait est inexplicable dans la théorie de M. Pasteur. M. Pasteur n'a jamais dit que, quelle que soit la réaction d'un liquide, et par conséquent quelle que soit sa composition, les organismes qui y prendront naissance seront toujours les mêmes. Certains organismes se développent surtout dans les liquides alcalins, d'autres dans des liquides neutres, d'autres enfin dans des liquides acides; par conséquent, lors même qu'un liquide renfermerait les germes de tous les organismes, il n'y aurait jamais qu'un petit nombre d'entre eux qui se développeraient : c'est ainsi, par exemple, que les petites bactéries mobiles qui pullulent si rapidement dans les liquides légèrement alcalins n'apparaissent jamais dans le moût de raisin, qui est fortement acide. C'est se tromper grandement que de penser qu'un organisme quelconque puisse se développer dans un liquide organique également quelconque.

Expériences qui établissent la présence dans l'air des germes des différents organismes microscopiques.

La théorie de M. Pasteur implique la nécessité de démontrer qu'il y a, dans les particules solides en suspension dans l'air, quelque chose donnant naissance aux différents organismes qui se développent dans les liquides ou infusions organiques. Cette démonstration a été faite par M. Pasteur depuis longtemps. En effet, dans son Mémoire de 1862 déjà cité, M. Pasteur reconnaît d'abord qu'il y a dans l'air des corpuscules qui ont toutes les apparences de ferments organisés. Pour les isoler, il suffit de faire passer un courant d'air sur une bourre de coton nitrique, puis de dissoudre ce coton dans un mélange d'alcool et d'éther. Le dépôt, lavé et décanté plusieurs fois, montre alors, outre des cristaux de différentes espèces et des cellules d'amidon qu'il est facile de recon-

naître par la teinture d'iode, d'autres corpuscules de formes variables ayant toutes les apparences de corpuscules organisés. Les uns sont sphériques, les autres ovoïdes, avec des contours plus ou moins nettement accusés. Parmi ces corpuscules se trouvent des spores de moisissures, et ce que M. Pasteur appelle les *germes de ferments*. Mais est-il possible de dire que telle cellule est un germe de ferment alcoolique, ou un germe de torula, ou même une spore de moisissure? M. Pasteur ne le pense pas. On connaît si peu la forme des germes des différents organismes, qu'il est impossible à l'observateur même le plus habile de dire avec certitude: Ceci ou cela est le germe de tel ou tel ferment, ceci est une spore et une spore de telle ou telle moisissure. Il est déjà si difficile de reconnaître, par un simple examen microscopique, les différents organismes pendant leur développement, qu'on comprend l'incertitude qui doit exister sur leurs germes, dont beaucoup, d'ailleurs, sont encore complètement inconnus. Tout ce que nous pouvons dire sur la foi de cette expérience, c'est qu'il existe dans les poussières de l'air des corpuscules qui ont tout à fait l'apparence de corps organisés.

Comment acquérir la certitude que dans ces poussières se trouvent vraiment les germes des différents ferments? Il n'y a qu'un seul moyen: introduire ces poussières dans des liquides stériles convenablement appropriés. La première question à résoudre est donc d'obtenir des liquides inaltérables. On ne peut pas songer aux liquides naturels, car, le plus souvent, ils sont très-difficiles à obtenir tout à fait exempts de germes. Il faut donc stériliser des liquides par l'action de la chaleur. Deux cas peuvent se présenter:

1° Le liquide est notablement acide, comme, par exemple, le moût de raisin, l'eau de levûre, l'urine, etc.; dans ce cas, l'ébullition directe pendant quelques instants suffit, à la condition de laisser rentrer de l'air pur;

2° Le liquide est peu acide ou légèrement alcalin; alors, le plus souvent, l'ébullition pendant quelques instants ne suffit plus; il faut ou bien prolonger l'ébullition pendant très-longtemps, ou mieux porter ces liquides pendant un court espace de temps à la température de 110 à 115 degrés. M. Pasteur a atteint ce résultat en faisant bouillir les liquides sous une pression convenable; il est plus simple

de les mettre en vase scellé que l'on plonge dans un bain de chlorure de calcium dont on élève progressivement la température.

Pour introduire les poussières de l'air dans ces liquides, il y a également deux méthodes : recueillir d'abord les poussières sur une bourre d'amiante ou de coton et mettre cette bourre dans le liquide altérable, ou bien placer simplement le liquide au contact de l'air ⁽¹⁾. Ces diverses méthodes ont été employées avec un plein succès par M. Pasteur, soit en 1862, soit ultérieurement. Dans tous les cas, et avec tous les liquides sur lesquels il a opéré, il s'est produit des organismes : moisissures, bactéries, vibrions, ferment de l'urée, ferment lactique, etc.

Les partisans de l'hémiorganisme pourraient objecter que le simple contact de l'air, indépendamment des poussières qu'il contient, est suffisant pour produire des organismes. Mais il est facile, et j'ai répété souvent cette expérience, de faire passer un courant d'air continu dans l'appareil en prenant la précaution d'arrêter les poussières solides à l'aide d'un tube de coton roussi ⁽²⁾; alors il n'y a plus aucune altération. C'est donc dans les poussières solides existant en suspension dans l'atmosphère qu'il faut placer l'origine des ferments ou autres organismes qui se développent dans les infusions mises au contact de l'air. Or, on ne peut pas admettre que la vie soit provoquée par des particules minérales; il y a donc dans l'air des corpuscules organisés vivants qui, placés dans des milieux convenables, donnent naissance aux différents ferments. Ce sont ces corpuscules organisés qu'on désigne sous le nom général de *germes*, et ce sont ces germes que le microscope nous montrait tout à l'heure.

On ne comprend guère, quand on considère la facilité avec laquelle

⁽¹⁾ Il y a encore une troisième méthode, qui consiste à faire bouillir les liquides dans des ballons effilés qu'on ferme à la lampe pendant l'ébullition. Après refroidissement, un vide partiel existe dans le ballon. On se transporte dans l'endroit où l'on veut constater la présence des germes, on casse la pointe : l'air pénètre dans le ballon; on referme la pointe et l'on porte à l'étuve.

Cette méthode a l'inconvénient de placer le liquide au contact d'une très-petite quantité d'air; aussi souvent n'y a-t-il pas d'altération. Enfin, la quantité d'air enfermé est limitée, ce qui est une mauvaise condition pour le développement des organismes aérobies.

⁽²⁾ J'appelle ainsi du coton qui a été porté à 200 degrés environ, pour détruire tous les germes qu'il peut renfermer.

les organismes se développent dans certains liquides exposés au contact de l'air, qu'on puisse nier l'existence des germes dans l'air. Aussi n'est-ce pas sur les germes des organismes très-communs, comme le ferment ammoniacal, les vibrions, le ferment lactique, etc., que la discussion a porté, mais surtout sur les germes du ferment alcoolique. Nous allons voir en effet que, si les germes de ce dernier ferment existent presque constamment dans l'air, au moins dans l'air de certaines localités et à certaines époques, du moins ils sont beaucoup moins répandus que les partisans de la génération spontanée voudraient le faire croire comme nécessité de la vérité des opinions contraires.

Voyons d'abord les expériences qui pourraient faire mettre en doute l'existence des germes de levûre dans l'air.

M. Pasteur, dans son Mémoire de 1862, dit que, dans un grand nombre d'expériences, où il semait des bourres d'amiante chargées des poussières de l'air dans de l'eau de levûre sucrée, il ne lui est jamais arrivé d'obtenir la fermentation alcoolique. Et cependant, ajoute-t-il, l'eau de levûre sucrée est constituée à la manière du moût de raisin, du jus de betteraves, etc.; elle est donc très-propre à la fermentation alcoolique.

M. Pasteur avait déjà été frappé de ce fait, et il croyait en avoir saisi la cause dans le rapport qui existe entre la quantité de liquide et la quantité d'air qui se trouvent dans le ballon, mais il a reconnu depuis que la véritable raison venait de la rareté des germes et de ce que, lorsque ces germes existent, ils mettent un temps plus ou moins long pour bourgeonner, et que l'oxygène leur est indispensable; or, dans l'eau de levûre dont l'acidité est faible, il se développe, au bout de deux ou trois jours, des bactéries mobiles qui absorbent tout l'oxygène, comme il le constate, car les moisissures qui avaient pris naissance sont arrêtées dans leur développement.

M. Fremy, dans la brochure qu'il a publiée en 1876, cite beaucoup d'expériences qui, d'après lui, prouvent qu'il n'y a pas de germes de ferments dans l'air.

Ainsi, après avoir recueilli les poussières de l'air sur une bourre de coton, il les introduit « dans les liquides qui conviennent le mieux au développement des germes, et qui étaient composés de sucre, de tartrate

d'ammoniaque et de cendres de levûre ; des moisissures se sont développées au bout d'un certain temps dans la liqueur, parce que les poussières contenaient des spores de mycodermes ; mais, dans ces essais, dit M. Fremy, que j'ai multipliés autant que possible, je n'ai jamais produit les fermentations variées qui auraient dû se manifester si l'air eût contenu des germes de ferments différents.

» J'ai soumis à de pareilles épreuves des poussières recueillies dans les localités les plus diverses ; elles ont souvent engendré des moisissures, mais dans aucun cas elles n'ont donné naissance aux fermentations que produisent les sucs de fruits, le moût de bière et le lait » (p. 74).

Ces faits ont été constatés pour la première fois par M. Pasteur (*voir* ses Mémoires de 1860 et de 1862 sur la fermentation alcoolique et sur la génération spontanée) ; de plus, dans la discussion qui eut lieu devant l'Académie des Sciences, M. Pasteur a déjà montré que l'interprétation de M. Fremy n'est pas admissible ; d'ailleurs, je vais passer en revue chacun des points séparément et donner les nouvelles expériences que j'ai faites à ce sujet.

M. Fremy sème les poussières de l'air dans un liquide artificiel qui, dit-il, est un de ceux qui *conviennent le mieux* au développement des germes, mais c'est là une assertion que je ne vois démontrée nulle part. Sans doute, M. Pasteur a démontré rigoureusement que de la levûre semée dans un pareil liquide se développe assez facilement et donne naissance à de nouvelles cellules. Cette expérience était excellente pour combattre la théorie de Liebig, d'après laquelle la levûre était toujours produite spontanément par une matière albuminoïde existant dans les liquides sucrés, car là la matière albuminoïde fait défaut ; mais rien n'autorise à conclure que ce milieu est un de ceux qui conviennent le mieux au développement des germes. La levûre adulte ne se reproduit, en effet, dans un pareil milieu, qu'avec une assez grande difficulté, et, certes, il n'y a aucune comparaison entre ce développement, quant à la facilité et la rapidité, et celui qui a lieu dans un liquide sucré naturel, comme le moût de raisin bouilli par exemple. Au reste, M. Fremy le dit lui-même (p. 30) : « Je ne crois pas que, dans le développement de la levûre de bière, le mélange artificiel proposé par M. Pasteur puisse jamais remplacer les substances albumi-

neuses diverses apportées aux cuves de fermentation par les céréales dans la fabrication de la bière. » Si, de plus, on observe que les germes de levûre, qui sont probablement, dans la plupart des cas, des cellules vieilles et desséchées, se développent avec beaucoup plus de difficultés que les cellules jeunes qui sont dans toute leur activité vitale, on verra que M. Fremy a eu recours, non à un des liquides qui *conviennent le mieux* au développement des germes de levûre, mais bien à un de ceux qui *conviennent le moins*.

Si, au lieu de semer les poussières de l'air dans un milieu artificiel, on les avait semées dans un liquide naturel, tel que le moût de raisin bouilli, il est probable que la fermentation aurait eu lieu, au moins dans un certain nombre de cas.

J'ai recueilli, en effet, des poussières de l'air sur une bourre d'amiante préalablement flambée en produisant une aspiration d'air pris dans la rue, à une hauteur de 3 mètres environ. Je laissais passer le courant d'air pendant un ou deux jours, puis j'introduisais la bourre, qui avait alors pris une teinte grisâtre par les poussières qui s'y étaient déposées, dans un tube de moût de raisin bouilli. Souvent, il est vrai, il n'y eut pas de fermentation et il ne se produisit que des moisissures, mais ce résultat est loin d'être constant. Les expériences dont je parle ont été faites surtout dans l'année 1876, pendant le printemps et au commencement de l'été. J'eus une première fermentation vers le 25 juin; la levûre était le *S. Pastorianus*. Le 8 juillet, j'eus une seconde fermentation, et cette fois, outre la levûre précédente, se trouvaient aussi des cellules rondes qui constituaient très-probablement une levûre différente. Je cessai les expériences à cette époque, mais je ne doute pas que, si j'eusse continué les essais, j'aurais encore obtenu plusieurs autres cas de fermentation, car à l'automne les germes de levûre sont beaucoup plus répandus, comme nous le verrons tout à l'heure.

Ainsi, en semant les poussières de l'air dans un liquide favorable au développement de la levûre, il se produit une fermentation alcoolique.

On peut remarquer néanmoins que le nombre des cas dans lesquels la fermentation se produisit est assez restreint, et nous allons en voir la cause. Parmi les germes de levûre existant dans l'air, il en est qui ont une vitalité plus ou moins grande et, par suite, mettent un temps

plus ou moins long pour bourgeonner lorsqu'ils se trouvent placés dans un liquide sucré. D'autre part, nous savons aujourd'hui que l'oxygène est absolument indispensable pour permettre aux cellules-germes de se développer. Enfin, il est nécessaire de faire observer que, lorsqu'on sème une bourre d'amiante recouverte des poussières de l'air, on sème en même temps que les germes de levûre un grand nombre de spores de moisissures. Or, parmi celles-ci, il en est qui ont une grande vitalité et qui, par suite, se développent les premières. La moisissure envahit rapidement le liquide, s'empare de tout l'oxygène qu'il contenait en dissolution, et les germes de levûre ne peuvent plus se développer. Ce serait seulement lorsque, parmi les germes introduits, quelques-uns d'entre eux auraient assez de jeunesse et de vie pour bourgeonner promptement, que la fermentation pourrait avoir lieu, car alors tout l'oxygène dissous n'aurait pas encore été absorbé par les moisissures. J'exposerai tout à l'heure une méthode qui nous permettra d'éviter les inconvénients que je viens de signaler et qui se prêtera beaucoup mieux à l'étude des germes de levûre qui existent dans l'air.

Revenons aux observations de M. Fremy. En semant les poussières de l'air dans le milieu minéral dont il s'est servi, il n'a jamais obtenu « les fermentations variées qui auraient dû se manifester si l'air eût contenu des germes de ferments différents ». Puis il ajoute immédiatement que ces poussières « n'ont pas donné naissance aux fermentations que produisent les sucres de fruits, le moût de bière et le lait ». Il semble d'après cela que, en semant les poussières de l'air dans un milieu minéral, on devait obtenir toutes les fermentations si variées qui se produisent dans les liquides organiques naturels ou artificiels. Avant de conclure ainsi, il eût fallu préalablement s'assurer que ces différentes fermentations pouvaient réellement se produire dans le milieu artificiel en question. Si l'on eût semé dans le liquide minéral Pasteur les organismes qui peuvent vivre dans le moût de bière et le lait, on aurait vu, le plus souvent, que ces organismes ne se développaient pas; il est donc bien naturel que les poussières de l'air n'aient pas produit les fermentations dont il vient d'être question.

Parmi tous les liquides que l'on peut employer pour rechercher la présence des germes de levûre alcoolique dans l'air, celui qui convient

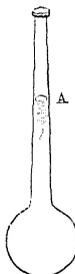
le mieux est sans contredit le moût de raisin bouilli. Il fermente naturellement, par conséquent il doit contenir tous les éléments qui conviennent au développement de la levûre; de plus, il a une acidité telle, que beaucoup d'organismes ne peuvent pas s'y développer. Ainsi, pas de bactéries pour absorber l'oxygène dissous comme avec le moût de bière, pas de vibrions, pas de ferment lactique, pas de ferment de l'urée, etc. La levûre, les moisissures et les torulas sont à peu près les seuls organismes qui puissent vivre dans le moût de raisin. Les torulas ne paraissent pas nuire au développement de la levûre; restent donc les moisissures qui absorbent plus ou moins rapidement l'oxygène en dissolution. Il serait désirable de pouvoir tuer les spores des moisissures sans nuire aux germes des ferments, mais on n'est pas encore arrivé à ce résultat⁽¹⁾. Si l'on ne peut éliminer complètement les moisissures, du moins on peut faire en sorte qu'elles nuisent le moins possible au développement des germes de levûre. La méthode suivante, employée autrefois par M. Pasteur, me paraît excellente sous ce rapport.

On prend des cuvettes en porcelaine peu profondes, dont la surface est d'environ 200 centimètres carrés. On les plonge dans l'eau bouillante de façon à tuer les germes de moisissure ou de levûre (ces germes sont tués, en effet, entre 60 et 70 degrés), on les retire à l'aide d'une pince qui a été elle-même dans l'eau bouillante et on les expose en plein air, sur une terrasse, dans un jardin, etc.; puis on ajoute du moût de raisin étendu de son volume d'eau et qu'on vient de faire bouillir dans un ballon. Le moût est donc mis bouillant dans les cuvettes. On laisse le tout exposé à l'air pendant le temps que l'on juge convenable, vingt-quatre ou quarante-huit heures. Pendant cet intervalle on prépare des ballons à long col (*fig. 15*), dont la contenance doit être très-sensiblement égale au volume du moût qui se trouve dans chaque cuvette. On fait bouillir une petite quantité d'eau au fond des ballons et on les

(¹) M. Fremy a cru démontrer que les moisissures ne nuisaient pas au développement de la levûre en semant à la fois les deux organismes dans un milieu convenable. Dans ce cas, les deux organismes commencent à se développer en même temps; mais les cellules de levûre semées ne sont pas comparables aux germes, qui mettent toujours plus longtemps pour bourgeonner. Avec la levûre fraîche, le développement a lieu très-rapidement et les moisissures n'ont pas le temps d'absorber tout l'oxygène dissous; d'ailleurs, l'oxygène n'est pas indispensable pour le bourgeonnement des cellules jeunes, ainsi que l'a montré M. Pasteur.

ferme à l'aide de bouchons flambés, de sorte qu'ils sont privés de germes. On a eu soin aussi de mettre dans de l'eau bouillante un nombre d'entonnoirs en verre égal au nombre des cuvettes. Au moment d'introduire le moût des cuvettes dans les ballons, on prend un entonnoir à l'aide d'une pince flambée, on le place sur le ballon, on

Fig. 15.



flambe un coin de la cuvette et on verse le moût par ce coin. On referme les ballons et on les porte à l'étuve à la température de 25 à 30 degrés.

Voyons les avantages de cette méthode : 1^o le moût de raisin reste exposé en petite épaisseur au contact de l'air pendant assez longtemps, de sorte qu'il se sature d'oxygène, et les germes de levûre peuvent déjà, avant la mise en ballons, se préparer (si je peux m'exprimer ainsi) pour le bourgeonnement. De plus, le liquide s'élève assez haut dans le col du ballon, jusqu'en A par exemple, de sorte que les moisissures, se formant généralement à la surface, n'absorbent pas assez vite l'oxygène dissous dans le moût qui est dans le ballon lui-même. Les germes de levûre qui sont tombés au fond du ballon peuvent donc se développer. Quelquefois, il est vrai, un mycélium envahit toute la masse du liquide, mais ce n'est pas là le cas général.

On doit chercher à avoir du liquide jusqu'à une hauteur assez grande dans le col du ballon. Si, par suite de l'évaporation, la quantité de liquide est trop petite, on ajoute de l'eau bouillie et refroidie; si, au contraire, elle est trop grande, ce qui arrive lorsqu'il a plu, on met le liquide dans deux ballons ou bien on en rejette une partie et l'on ne conserve que ce qui est nécessaire pour remplir un ballon.

Cette méthode a l'inconvénient d'exiger un matériel embarrassant

et compliqué, surtout lorsqu'on veut faire une expérience loin d'un laboratoire, en pleine campagne par exemple; on se heurte alors à de très-grandes difficultés. Dans ce cas particulier, j'opère de la façon suivante :

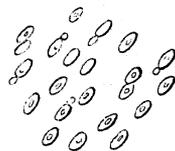
Au lieu de cuvettes je prends des tubes à essai, au fond desquels je fais bouillir une petite quantité de moût de raisin étendu d'eau, puis je les ferme avec des bouchons flambés. L'expérience montre que ces tubes se conservent toujours sans altération. On les transporte dans l'endroit où l'on veut rechercher la présence des germes de levûre dans l'air. On enlève les bouchons, qui sont numérotés de façon à pouvoir être replacés sur les tubes où ils étaient primitivement. Lorsque le moût est resté suffisamment longtemps au contact de l'air (ordinairement deux ou trois jours), on replace les bouchons et on rapporte les tubes à l'étuve.

Cette méthode, évidemment beaucoup plus simple que celle des cuvettes, offre la plupart des avantages de celle-ci; le moût reste exposé à l'air deux ou trois jours, pendant lesquels les cellules-germes se préparent au bourgeonnement. Toutefois, les moisissures absorbent beaucoup plus vite l'oxygène en dissolution, parce que l'épaisseur du liquide est beaucoup plus petite et que la quantité est elle-même plus petite. Il faut également préparer un nombre considérable de tubes pour avoir une surface de contact avec l'air aussi grande que celle d'une cuvette seulement. Cependant, cette méthode donne de très-bons résultats lorsqu'on veut comparer les germes de levûre pouvant exister dans des lieux différents et à des époques différentes.

J'ai fait de très-nombreuses expériences, soit avec les tubes, soit avec les cuvettes. En voici quelques-unes :

Le 19 juin, on expose neuf cuvettes sur la terrasse du laboratoire de

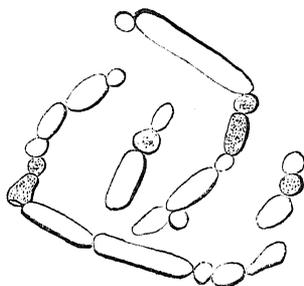
Fig. 16.



M. Pasteur. Deux jours après, le contenu des cuvettes est mis dans des ballons à long col. Le temps avait été beau. Dès le 25, deux ballons

fermentent par une levûre analogue à celle des fermentations basses (*fig. 16*). Un troisième ballon fermente aussi deux jours après, mais le liquide ne se trouble pas comme dans les fermentations ordinaires; au microscope, on constate la présence du *mucor racemosus* (*fig. 17*). Enfin,

Fig. 17.



dans ce dernier ballon et dans un des précédents, on voit à la surface un voile blanc de *mycoderma vini* (*fig. 18*). Les six autres ballons n'ont donné que des moisissures.

Fig. 18.

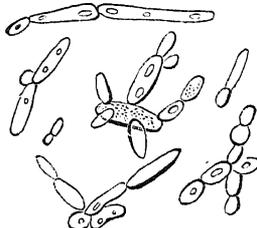


Les 29 et 30 juin, on répète la même expérience. Beau temps. Dès le 5 juillet un ballon fermente, et, quelques jours après, tous les ballons, sauf *un seul*, sont en pleine fermentation. La levûre est une levûre ovale, allongée comme celle des fruits. Pas de *mycoderma vini*. Dans quelques ballons on trouve le *mucor racemosus*, qui s'est développé en même temps que la levûre.

Troisième expérience le 7 juillet. Cette fois, les cuvettes ne restent exposées que *vingt-quatre heures*. Beau temps. Le 12 juillet, cinq ballons fermentent par une levûre formée de cellules ovales et allongées, assez souvent réunies en paquets; c'est à cette levûre qu'on donne le nom de *levûre de fruits* (*fig. 19*), parce qu'elle se forme principalement dans la fermentation des fruits sucrés, ou encore de *saccharomyces Pastorianus*, parce qu'elle a été signalée pour la première fois

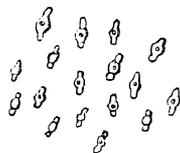
par M. Pasteur. Dans deux de ces ballons on trouve, en outre, une petite levûre formée d'une cellule portant deux pointements aux extré-

Fig. 19.



mités du grand diamètre et à laquelle on donne le nom de *levûre apiculée* (fig. 20). Le 13 juillet, trois autres ballons fermentent par la levûre des fruits. Le neuvième ballon n'a donné que des moisissures.

Fig. 20.



Ces trois expériences nous démontrent de la façon la plus nette l'existence des germes de levûre dans l'air, conformément aux résultats déjà trouvés par M. Pasteur. On voit aussi qu'il y a des germes de levûres très-différentes. Il est probable qu'il y a beaucoup d'espèces de levûres, de même qu'il y a beaucoup d'espèces de moisissures. Les levûres formeraient une classe spéciale différant surtout des moisissures en ce qu'elles peuvent vivre dans les liquides sucrés en décomposant le sucre et donnant comme produits principaux de cette décomposition de l'alcool et de l'acide carbonique.

C'est à cette époque que je fus amené à rechercher si les germes de levûre se trouvaient en proportion variable dans les différents lieux, et c'est alors que j'imaginai de remplacer les cuvettes par des tubes.

Le 21 juillet, je porte dix-huit tubes dans les bois, au-dessus de Bellevue. J'en place quatre dans un buisson, quatre sur la lisière du bois et dix dans un jardin où se trouvent des fraises mûres en assez grande

quantité. Le 23, il fait un orage suivi d'une forte pluie. Le 24, les tubes sont bouchés et rapportés au laboratoire. Le 28, tous les tubes placés dans le buisson et la lisière du bois fermentent; parmi les dix qui se trouvaient dans le jardin, quatre seulement ont fermenté. La levûre des fruits n'existait que dans un tube; dans tous les autres on trouvait la levûre ovale et ronde, associée quelquefois au *mucor*.

En même temps, j'avais placé dix tubes sur la terrasse du laboratoire, à Paris. Parmi ces dix tubes, deux seulement ont fermenté par la levûre des fruits.

Je fus d'abord un peu surpris de voir que tous les tubes placés dans le buisson ou sur la lisière du bois avaient fermenté; mais, avec un peu de réflexion, je me suis bien vite aperçu que ces tubes avaient dû recevoir plus de poussières de l'air que les autres, puisque la pluie avait entraîné celles qui étaient sur les feuilles des arbres.

Vers le milieu du mois d'octobre, j'ai fait une autre expérience qui montre beaucoup mieux que les germes de levûre sont très-inégalement répandus. On était alors en pleine vendange dans le Jura; je porte quatorze tubes au milieu d'une vigne où la récolte n'est pas faite, quatorze autres dans la plaine, où la vigne n'est presque plus cultivée, enfin quatorze dans la montagne, où la vigne n'existe pas. Tous ces tubes restent exposés aux poussières de l'air pendant trois jours environ.

Parmi les quatorze tubes placés dans la montagne, aucun n'a fermenté. Outre les moisissures, on trouve dans quelques-uns des *dematium ronds* ou *ovales*, ayant une très-grande ressemblance avec la levûre; ils en diffèrent surtout en ce qu'ils ne font pas fermenter les liquides sucrés. Pas de *mycoderma vini*.

Parmi les quatorze tubes placés dans la plaine, trois ont fermenté, un par la levûre apiculée, un autre par le *mucor*, et le troisième par le *mucor* et une petite levûre ronde. Les autres se sont couverts de moisissures, et dans quelques-uns on retrouvait des *dematium*. Un d'eux est recouvert de *mycoderma vini*.

Enfin, lorsqu'on va chercher les tubes qui sont dans la vigne, il y en a déjà deux qui sont en pleine fermentation. Le lendemain, trois nouveaux tubes fermentent, et successivement trois autres les jours suivants. Dans six de ces tubes on trouve la levûre apiculée, mélangée

quelquefois avec une petite levûre ovale; dans un autre, du *mucor*; le dernier renferme un mélange de *mucor* et de petite levûre ovale. Tous les autres se sont couverts de moisissures, avec un dépôt plus ou moins considérable de *dematium*.

Ainsi, sur un même nombre de tubes, huit ont fermenté parmi ceux qui étaient placés dans la vigne, trois parmi ceux placés dans la plaine, et aucun parmi ceux qui étaient dans la montagne. Il est donc évident que les germes de levûre sont très-inégalement répandus dans l'air des différentes localités. Ces germes existent surtout là où se trouvent des fruits sucrés, et en particulier des raisins, au moment de leur maturité.

On pourrait être étonné qu'il y ait eu trois tubes fermentant parmi ceux placés dans la plaine, tandis qu'il n'y en a pas eu un seul parmi ceux qui se trouvaient dans la montagne. Mais je ferai remarquer que les poussières de l'air doivent être transportées par les vents beaucoup plus facilement dans la plaine, où il n'y a presque pas d'inégalités de terrain, que dans la montagne, où ces inégalités sont considérables. D'ailleurs, dans la plaine, les tubes étaient dans le voisinage d'un chemin de fer qui transportait des vins blancs en pleine fermentation. Il est bien possible que quelques germes aient été apportés de cette façon.

Pendant plus de trois mois, août, septembre et octobre, j'ai placé tous les huit jours un même nombre de tubes dans un même endroit, et toujours j'ai eu la fermentation dans un certain nombre d'entre eux. La moyenne était de un à trois tubes fermentant sur six exposés à l'air.

Une dernière objection de M. Fremy contre la présence des germes dans l'air (p. 75) :

« On sait que l'eau de pluie entraîne presque tous les organismes qui existent dans l'air; donc, dit M. Fremy, s'il existait dans l'air des germes de ferments, la pluie devrait les entraîner comme elle enlève les œufs d'infusoires et les spores de mycodermes.

» En faisant fermenter à l'air du suc de raisin, du moût de bière, du lait ou de l'eau de levûre sucrée, je n'ai jamais constaté de différences entre ces fermentations opérées avant ou après la pluie. Donc, les poussières de l'air n'agissent en aucune manière sur les phénomènes de fermentation. »

Plus loin, M. Fremy ajoute « que les liquides fermentescibles, tels

que le lait, le suc de raisin, le moût d'orge, l'eau de levûre sucrée, fermentent aussi facilement sur les montagnes élevées que dans les villes » (p. 76), ce qui ne devrait pas être, puisque M. Pasteur a montré que l'air pris sur les hautes montagnes est sensiblement pur.

Mais M. Fremy oublie la seule chose essentielle, qui est de priver ses liquides de germes avant de les exposer à l'air. Il est évident qu'il importe peu que l'air soit pur ou impur, si les liquides fermentescibles sont eux-mêmes remplis de germes. En stérilisant les liquides, j'ai constaté, au contraire, que les choses se passent comme l'indique la théorie; mais je n'insisterai pas.

Après avoir montré que les germes de levûre existent dans l'air en assez grande quantité pendant l'été et l'automne, je me suis proposé de rechercher si ces germes y existent à toutes les époques de l'année. J'ai employé des cuvettes, parce que les germes deviennent plus rares pendant l'hiver. L'exposition à l'air a toujours duré deux jours. Voici quelques-uns des résultats :

Les 6-8 novembre, expérience avec dix cuvettes. Beau temps.

Le 11, un ballon fermente par levûre apiculée et ovale.

Le 18, un autre ballon fermente par levûre ovale ordinaire.

Les autres ballons n'ont manifesté aucune espèce de fermentation; un d'entre eux s'est recouvert de *mycoderma vini*.

Les 15-17 novembre, nouvelle expérience avec dix cuvettes. Pluie du 16 au 17; je rejette une partie du liquide surnageant, pour que le reste puisse être contenu dans les ballons à long col.

Dès le 18, trois ballons fermentent par la levûre apiculée.

Du 20 au 21, trois autres ballons entrent en fermentation; mais ici, outre la levûre apiculée, qui est assez rare, on trouve beaucoup de levûre des fruits.

Le 22, deux autres ballons fermentent, l'un par la levûre des fruits, et l'autre par un mélange de levûre ovale et de *mucor*.

Les deux derniers n'ont donné aucun signe de fermentation.

Je ferai remarquer que cette expérience est la première dans laquelle je retrouve la levûre allongée des fruits depuis le mois d'août.

Les 11-13 décembre, nouvelle expérience avec dix cuvettes. Petite pluie le 12 au soir; mais le volume du liquide n'a pas sensiblement augmenté.

Le 14, un ballon fermente par la levûre apiculée.

Du 18 au 21, quatre ballons fermentent par la levûre des fruits.

Du 25 au 26, trois autres ballons fermentent par la même levûre.

Les deux autres n'ont donné que des moisissures.

Les 15-17 janvier 1877, expérience avec dix cuvettes. Quelques gouttes de pluie le 16.

Le 25, un ballon fermente par la levûre des fruits.

Le 10 février, autre ballon qui fermente par la même levûre. A cette époque, on voit quelques bulles qui s'élèvent du fond d'un troisième ballon. Pas de trouble. Trois jours après, le trouble se manifeste, et la fermentation est très-active. Levûre ovale.

Le 6 mars, un quatrième ballon commence à fermenter d'une manière analogue au précédent. Le 13, la fermentation étant assez active, on examine la levûre au microscope et l'on voit qu'elle est formée par des cellules rondes, plus grosses que la levûre ordinaire, à contours noirâtres, avec granulations à l'intérieur. Il est fort possible que ce soit un *mucor* particulier.

Les cinq autres ballons n'ont donné que des moisissures.

Les 10-12 mars, nouvelle expérience avec dix cuvettes. Beau temps.

Le 16, un ballon fermente activement par un mélange de levûre ronde et de petite levûre ovale.

Le 21, un autre ballon fermente par levûre ronde.

Tous les autres n'ont jamais manifesté le moindre signe de fermentation.

Les 26-28 avril, nouvelle expérience avec dix cuvettes. Orage et pluie le 27.

Le 16 mai, un ballon commence à fermenter, mais on ne voit que de très-légères bulles, sans trouble général. Le 2 juin, la fermentation a complètement cessé; j'examine la levûre : elle est constituée par des cellules rondes réunies en paquets (*fig. 21*). En semant cette levûre, elle fait fermenter un liquide sucré, mais très-lentement et sans trouble général. Le sucre n'est pas entièrement décomposé, car, si l'on sème de la levûre ordinaire, il y a encore une petite fermentation.

Un deuxième ballon a aussi commencé à fermenter, surtout dans le col, vers le 15 mai; la levûre qui se déposait sur le col incliné est tombée peu à peu dans le ballon; les bulles se sont alors élevées du

fond du ballon, mais toujours avec beaucoup de lenteur; la fermentation a duré plus de quatre semaines; au microscope, la levûre est formée de cellules très-allongées avec des granulations intérieures; peut-être n'était-ce que du *mycoderma vini*. En ensemençant cette levûre

Fig. 21.



dans un tube de moût de raisin, il se produit très-rapidement un voile de *mycoderma vini* en même temps que quelques rares bulles s'élèvent du fond du tube.

Conséquences. — Il y a des germes de levûre dans l'air à toutes les époques de l'année, puisque dans toutes les expériences un certain nombre de ballons ont éprouvé la fermentation, mais les germes y existent en proportion variable. Lorsqu'il pleut pendant que les cuvettes sont exposées à l'air, il y a un plus grand nombre de ballons qui fermentent, ce qui tient à ce que la pluie a entraîné les germes qui se trouvent dans l'atmosphère.

Les germes se développent au bout d'un temps très-variable, deux ou trois jours dans quelques cas, quinze jours et même davantage dans d'autres. On voit ainsi la nécessité d'empêcher les moisissures d'envahir tout le liquide, car elles absorberaient tout l'oxygène dissous, et les germes ne pourraient plus bourgeonner.

Ces résultats nous permettent de comprendre comment M. Fremy a pu être induit en erreur, tout à fait à son insu; lorsqu'il a annoncé qu'il n'y avait pas de germes de levûre dans l'air. En effet, outre que le liquide dont il s'est servi de préférence est très-mal choisi, il a probablement pensé qu'il suffisait de l'exposer pendant quelques instants, quelques heures au plus, au contact de l'air pour recueillir des germes; de plus, il ne dit pas à quelle époque de l'année il a opéré, si les vases présentaient une large surface de contact avec l'air; enfin il n'a pris aucune précaution pour éviter l'influence des moisissures. Si M. Fremy

voulait bien répéter l'expérience dans les conditions où je me suis placé, je ne doute pas qu'il n'obtienne des résultats semblables aux miens.

Germes de levûre sur les grains et les grappes de raisin.

Plusieurs fois dans le courant de ce travail j'ai avancé que les germes de levûre alcoolique étaient très-répandus sur les grains de raisin, et particulièrement sur les grappes. Ce fait très-important a été découvert par M. Pasteur, il y a déjà plusieurs années. Après avoir constaté que dans l'air ces germes sont peu abondants, et que cependant les différentes parties d'un raisin fermentent presque toujours, à la condition de réunir un certain nombre de grains, M. Pasteur pensa que les germes ne devaient pas toujours venir des poussières de l'air, et qu'ils existaient probablement sur les grains et sur les grappes. Pour vérifier cette idée, il introduisit dans des tubes de moût de raisin bouilli des fragments de grappe, avec toutes les précautions nécessaires pour éviter les germes de l'air. Dans la grande majorité des cas, il y eut fermentation. De très-petits fragments de grappe suffisent même pour faire fermenter un certain nombre de tubes, mais naturellement ce nombre est d'autant plus grand que les fragments introduits sont plus gros. Il n'est même pas nécessaire de mettre la grappe elle-même; il suffit de la laver avec un petit pinceau bien propre et de semer l'eau de lavage dans le moût de raisin bouilli. De même, l'eau de lavage des grains provoque encore la fermentation, mais moins fréquemment. Aussi M. Pasteur a-t-il conclu de ses expériences que les germes de levûre étaient très-répandus sur les grappes et qu'ils existaient aussi sur les grains, quoique en proportion moindre. Ce sont ces germes qui, évidemment, provoquent la fermentation des cuves de vendange et non ceux de l'air. Ces derniers sont en effet en assez petite quantité, et plus ou moins desséchés; ils mettraient donc un temps plus long pour se développer et produire la fermentation d'une aussi grande masse de matières sucrées.

Je n'ai pas besoin de faire remarquer combien la découverte de ces germes est contraire à la théorie de M. Fremy, d'après laquelle la

levûre est toujours produite spontanément par le jus de raisin. Voici ce que répond M. Fremy à cette expérience, qu'il ne conteste pas (p. 59) :

« Il faut bien se garder de confondre une fermentation alcoolique véritable, qui se produit *immédiatement* dès que le ferment alcoolique est en présence de la liqueur sucrée, avec une fermentation qui est la conséquence de la production des moisissures.

» Cette fermentation du moût de raisin cuit, sous l'influence des poussières, ne se fait pas immédiatement, comme dans l'action de la levûre de bière sur le sucre.

» La fermentation du moût de raisin cuit n'a lieu que lorsqu'il s'est formé des moisissures dans les liqueurs. Or, on sait aujourd'hui que les moisissures engendrent des ferments.

» M. Pasteur établit donc ici, au profit de ses théories, une confusion entre la génération des ferments et celle des moisissures. »

Ainsi, les cellules de levûre sont produites par des moisissures. Mais alors comment se fait-il que M. Fremy, dans toutes les expériences où il a exposé des liquides fermentescibles au contact de l'air, n'obtienne pas la fermentation alcoolique, puisque, de son aveu, il obtient des moisissures? M. Fremy dira peut-être que toutes les moisissures ne produisent pas du ferment alcoolique; dans ce cas, il se trouvera obligé d'admettre qu'il y a à la surface des grappes et des grains de raisin des moisissures spéciales qui, mises dans des liquides sucrés, donnent naissance à de la levûre et provoquent la fermentation. Alors nous voilà presque d'accord, car M. Pasteur pense, et je suis tout à fait de son avis, que les germes de levûre qui se trouvent à la surface des grappes ou des grains de raisin doivent provenir de certaines moisissures qui, à une certaine époque et sous certaines influences encore inconnues, émettraient des cellules spéciales ayant la propriété de bourgeonner dans des liquides sucrés et de décomposer le sucre. Mais où M. Fremy est, je crois, dans l'erreur, c'est lorsque ce savant regarde les moisissures qui se sont développées à la surface du liquide comme des producteurs de levûre alcoolique. En effet, en suivant le phénomène avec attention, on voit souvent la fermentation se déclarer avant d'apercevoir la moindre trace de moisissures. Dans les autres cas, pour conclure comme le fait M. Fremy, il aurait fallu ensemer les moisissures dans un liquide sucré et constater qu'elles le faisaient fermenter. Or, j'ai fait cela

bien souvent, et à la seule condition de prendre les précautions nécessaires pour avoir de la semence pure, je n'ai jamais eu de fermentation.

Poursuivons l'examen des expériences de M. Fremy.

« Mes recherches, dit-il, ont pour but d'établir qu'il se forme dans l'intérieur des tubes mycodermiques, par conséquent, dans des conditions où les poussières de l'air ne peuvent pas pénétrer, des organismes qui agissent ensuite comme de véritables ferments.

» Lorsqu'on suit au microscope la formation des tubes mycodermiques qui se développent dans une dissolution d'acide tartrique, on reconnaît que ceux qui sont de nouvelle formation restent incolores, transparents, et qu'ils ne contiennent pas de particules solides dans leur intérieur.

» En vieillissant, ces tubes prennent de la couleur et se remplissent de corpuscules organisés qui peuvent sortir des tubes et se mettre en suspension dans la liqueur, soit spontanément, soit par une légère pression.

» Si l'on introduit cette végétation mycodermique dans une mousseline très-fine, et qu'on la comprime dans de l'eau distillée, il est facile de séparer mécaniquement les granules qui existent dans les tubes. En mettant séparément dans de l'eau sucrée ces deux parties de la végétation mycodermique, j'ai reconnu que les tubes n'agissaient que très-lentement sur le sucre, tandis que les granules, qui présentaient l'aspect de certains ferments, transformaient le sucre soit en acide lactique, soit en acide butyrique, et que dans cette fermentation il se dégagait tantôt de l'hydrogène, tantôt de l'acide carbonique.

» Voici donc un mode de génération des ferments bien nettement établi ; en suivant une végétation mycodermique, on assiste à la formation de véritables ferments qui s'engendrent dans des tubes organiques fermés, par conséquent dans des conditions où les prétendus germes atmosphériques de M. Pasteur, c'est-à-dire les poussières de l'air, ne peuvent pas pénétrer » (p. 87).

Il est visible qu'il n'a été prise aucune précaution pour éloigner les germes étrangers à la moisissure, germes pouvant se trouver dans l'acide tartrique, dans la mousseline, dans l'eau, dans l'air, etc. Aucune observation microscopique ne paraît avoir été faite pour

constater s'il y avait d'autres ferments que les granules dans le liquide sucré; enfin, après avoir observé une fermentation *lactique* ou *butyrique*, M. Fremy tire des conséquences relatives à la fermentation alcoolique.

Sans nous appesantir sur la question de savoir si certaines moisissures ne peuvent pas, dans des conditions particulières, donner naissance à du ferment alcoolique, nous pouvons assurer que jusqu'ici on n'est pas arrivé à suivre une telle transformation. Je m'empresse d'ajouter que la théorie de M. Pasteur ne serait aucunement ébranlée par une telle constatation.

Revenons aux germes de levûre existant sur les grappes et les grains de raisin.

En examinant l'eau de lavage des grappes, on voit, dit M. Pasteur, dans son Ouvrage intitulé *Études sur la bière*, « des cellules, les unes simples, translucides, incolores, d'autres plus grosses, colorées en jaune brun, libres ou réunies en amas irréguliers, et enfin des utricules pleins de spores prêtes à germer, quelques-unes en forme de gourdes. On retrouve en très-grand nombre les mêmes cellules dans l'eau de lavage des grappes de plants différents.

» Pour suivre au microscope la germination de ces diverses sortes de cellules, on dispose une goutte d'eau dans une petite quantité de moût de raisin bouilli. Les cellules jaune brun se ramollissent, se distendent et deviennent peu à peu translucides et incolores. En même temps, on voit apparaître sur leur pourtour des bourgeons très-jeunes qui grossissent vite et se détachent sous forme de jeunes cellules qui font place à d'autres, tandis que les précédents vont bourgeonner à leur tour. La rapidité du bourgeonnement et de la prolifération de ces cellules est souvent extraordinaire. Il y a d'autres groupes de cellules qui poussent tout de suite des tubes longs, cloisonnés à la manière des tubes de mycélium des moisissures ordinaires, en même temps que des cellules à profusion, lesquelles cellules se montrent également sur toute la longueur des tubes et souvent par bouquets. La preuve que parmi ces développements de cellules et de tubes il existe réellement la levûre ou les levûres de la vendange, c'est que, si l'on vient à semer une goutte de ce liquide dans du moût de raisin bouilli; la fermentation ne tarde pas à se déclarer. »

Ainsi, plus de doute possible : à la surface des grains de raisin, et surtout du bois de la grappe, se trouvent des cellules-germes.

M. Pasteur a reconnu également que ces cellules-germes n'apparaissent sur la grappe que lorsque le raisin est voisin de la maturité. Avant cette époque, les grappes mises dans des tubes de moût bouilli donnent des moisissures, des torulas, mais pas de levûre (1). De plus, ces germes sont répartis irrégulièrement; il y a des grains qui en portent et d'autres qui n'en portent pas. Il peut même arriver, comme cas particulier, qu'un raisin tout entier n'en porte pas : c'est ce que M. Pasteur a constaté sur une grappe de raisin noir frais acheté chez Chevet à la fin du mois d'avril. Ni les grains ni la grappe n'ont provoqué la fermentation. Je sais que ce raisin provenait d'une serre et se trouvait, par conséquent, dans des conditions défavorables pour recevoir les germes de l'air, mais on comprend que le cas puisse se présenter aussi pour un raisin ayant mûri en plein air.

Maintenant, d'où viennent les germes de levûre qui apparaissent ainsi au moment de la maturité sur tous les fruits sucrés, et en particulier sur les raisins? Je viens de laisser entrevoir qu'ils pourraient bien venir des germes de l'air (2). En effet, nous avons vu qu'il y a des germes dans l'air à toutes les époques de l'année, et qu'ils sont particulièrement nombreux pendant l'été et l'automne; par suite, ils doivent se déposer partout, et en particulier sur les raisins. Mais, tandis qu'ils resteraient à l'état inerte sur les différentes espèces de bois, ces germes pourraient vivre à la façon des moisissures et donner naissance à de nouvelles cellules-germes lorsqu'ils se trouveraient sur les fruits sucrés. Il y aurait ainsi une multiplication des cellules sur les grains de raisin et sur les grappes, multiplication qui se produirait seulement au moment de la maturité du fruit. Cette manière d'expliquer le phénomène permettrait de comprendre pourquoi les germes de levûre sont en général peu nombreux sur les premiers fruits sucrés.

(1) Il pourrait arriver qu'en faisant un grand nombre d'essais on eût la fermentation dans un ou deux tubes, mais cette fermentation serait provoquée par les germes de l'air qui se seraient déposés sur les grappes comme ils se déposent un peu partout.

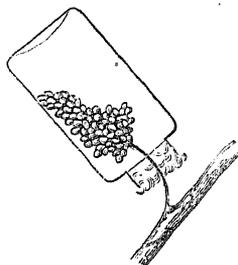
(2) M. Pasteur avait cru avoir démontré que ces germes étaient les mêmes que ceux du *mycoderma vini*, mais il a expliqué, dans son Ouvrage sur la bière, comment il avait été induit en erreur.

Mais ces germes pourraient avoir aussi une autre origine. Lorsqu'on met des fragments de bois ou des portions de fruits verts dans du moût de raisin bouilli, on constate qu'il se produit presque toujours, outre les moisissures de la surface, un dépôt quelquefois assez considérable de *dematium* ayant la plus grande ressemblance avec la levûre. Il serait donc possible que ces *dematium*, qui existent partout, sur le bois, sur les fruits verts, sur les brins d'herbe, pussent, à un moment donné de leur vie, agir à la façon des cellules de levûre.

Pour décider entre ces deux hypothèses, j'ai fait l'expérience suivante :

Au commencement du mois d'août, les raisins étant encore verts, j'ai enfermé un raisin dans un bocal de verre, comme le montre la *fig. 22*.

Fig. 22.



Le bocal avait été flambé pour le priver de tous les germes pouvant exister sur ses parois, et le goulot était bouché par un tampon de coton permettant la libre circulation des gaz, mais suffisant pour s'opposer à l'introduction des poussières de l'air. Le flacon était incliné, de sorte que quelques grains reposaient contre les parois.

Dans une autre expérience, j'avais placé un flacon plus petit tout à fait verticalement (*fig. 23*), et je n'avais pas pris la précaution de fermer l'ouverture avec du coton, pensant que les poussières de l'air avaient peu de chance de remonter dans l'intérieur.

Voici le raisonnement que j'avais fait :

Lorsque les raisins sont verts, il n'y a pas encore de cellules de levûre à leur surface, mais les *dematium* y existent en grande quantité; si donc ces *dematium* peuvent se transformer en levûre en végétant sur les raisins, ceux-ci devront éprouver la fermentation absolument comme

les raisins non enfermés; si, au contraire, les germes de l'air sont indispensables à la production des germes de levûre sur le raisin, ceux qui sont enfermés ne devront pas donner de fermentation.

Fig. 23.



Le 24 octobre, les raisins sont très-mûrs; celui qui est dans le petit bocal est magnifique; celui du grand n'est malheureusement pas aussi beau, beaucoup de grains qui touchaient les parois sont pourris et recouverts de moisissures.

Les grains du raisin sain sont mis dans trois tubes de moût de raisin bouilli, à raison de sept ou huit grains par tube. La grappe a été mise tout entière dans un autre. Aucun de ces tubes n'a donné de fermentation. Quant au raisin du grand bocal, les grains sains ont été mis dans deux tubes et la grappe dans un troisième; aucun d'eux n'a fermenté.

J'ai fait une expérience comparative avec d'autres raisins pris sur le même cep, mais non enfermés dans des bocaux. Les grappes, mises à peu près en même quantité que dans les expériences précédentes, ont toujours fait fermenter; quant aux tubes dans lesquels j'avais mis sept ou huit grains, j'ai eu en moyenne un tube sur quatre qui n'a pas fermenté.

Cette expérience a été reprise l'année suivante, en 1877. Seulement les raisins ont été d'abord mis dans des sacs de crin, afin d'éviter le contact direct des grains avec les parois de verre. Les résultats ont été absolument les mêmes. Il faut donc conclure que les *dematium* ne se transforment pas en levûre alcoolique et que les germes qui existent sur les fruits sucrés proviennent des germes de l'air.

M. Pasteur a cherché aussi si ces germes pouvaient se conserver pendant longtemps. A cet effet, les grappes étaient enfermées dans du papier de

soie et mises dans un grand bocal dans le laboratoire. A des intervalles plus ou moins éloignés, on prenait une partie de ces grappes pour les mettre dans du moût de raisin bouilli. M. Pasteur trouva ainsi que les germes actifs allaient en diminuant insensiblement; vers le commencement d'avril, la stérilité fut absolue.

Il existe dans le Jura un vin, dit *vin de paille*, qui paraît en contradiction avec ce fait, car il est fait avec des raisins conservés pendant très-longtemps sur de la paille après la récolte. Lorsqu'on fabrique ce vin après le mois d'avril, il ne devrait pas fermenter. Aussi M. Pasteur pense que la fermentation a lieu par la poussière de levûre répandue sur les ustensiles du vigneron depuis la dernière récolte, poussière qui conserve sa faculté de germination pendant plusieurs mois. Comme conséquence, si l'on écrasait les raisins dans des appareils privés de tous germes, il ne devrait pas y avoir fermentation.

Les faits que j'ai observés ne sont pas d'accord avec cette interprétation. J'ai mis, en effet, dans des tubes de moût de raisin bouilli des grains ou des fragments de grappes de raisin conservées depuis la récolte jusque vers la fin du mois de juin. J'ai obtenu la fermentation dans un grand nombre de tubes, soit par la grappe, soit par les grains, et la levûre qui se formait était la levûre allongée des fruits. Cette expérience a été faite en 1876 avec des raisins provenant de deux endroits différents; je l'ai répétée en 1877, et le résultat a été le même. On ne peut donc douter que, sur des raisins conservés, il existe encore des germes actifs de levûre à la fin du mois de juin. Le vin de paille, qui est toujours fabriqué avant cette époque, fermenterait donc lors même que les raisins seraient écrasés dans des ustensiles privés de tous germes.

La différence qui existe entre ces résultats et ceux constatés par M. Pasteur me paraît tenir aux conditions particulières dans lesquelles ont été conservées les grappes dont il s'est servi. Elles étaient, en effet, enveloppées dans un papier de soie et mises dans un bocal fermé. Il en résulte qu'elles se desséchaient très-vite, n'étant pour ainsi dire pas exposées aux variations hygrométriques de l'air. Les grappes de raisin conservées sont, au contraire, toujours plus ou moins humides; les germes peuvent donc garder leur vitalité beaucoup plus longtemps.

Il m'a paru intéressant de rechercher si les germes de levûre périsaient sur les grappes restant à la vigne pendant l'hiver. Pour cela, j'ai

enlevé les grains et laissé les grappes sur les ceps jusqu'au mois d'avril. Au bout de ce temps, il y avait encore des germes actifs, mais en proportion beaucoup plus petite que pour les vendanges. Il était évident qu'un certain nombre de cellules-germes étaient mortes. Il m'a paru aussi que les germes étaient plus nombreux sur des grappes venant d'une treille presque complètement à l'abri de la pluie que sur celles qui étaient restées en plein air au milieu des vignes, ce qui peut tenir à ce que la pluie avait entraîné un certain nombre des germes existant sur celles-ci (1).

Enfin, les germes de levûre se développent-ils à la fois sur les grains de raisin et sur les grappes, ou bien sur les grains seulement? Pour résoudre cette question, j'ai coupé les grains des grappes pendant que les raisins étaient encore verts. Toutes les grappes auxquelles on avait enlevé les grains avant le mois de juillet ont séché; mais celles dont les grains avaient été coupés vers la fin de juillet ont continué à vivre et sont restées vertes. On les a cueillies après les vendanges, c'est-à-dire au moment où les autres portaient beaucoup de germes, et on les a mises dans des tubes de moût de raisin bouilli. Avec une dizaine de ces grappes je n'ai pas eu un seul cas de fermentation.

Cette expérience a de nouveau été reprise en 1877, sur un plus grand nombre de grappes, et elle a donné absolument le même résultat.

Si nous admettons l'idée souvent émise que les germes sont des cellules détachées d'un organisme plus élevé, il résulte de là que cet organisme ne peut pas puiser sa nourriture sur la grappe du raisin; il n'y aurait que le grain lui-même, et seulement au moment de la maturité, qui pourrait lui fournir un aliment convenable et lui permettre de se développer. Cet organisme, encore inconnu, serait donc un parasite des fruits sucrés, de même que certaines moisissures sont des parasites de différentes plantes.

(1) Ces expériences ont été faites sur des grappes de la récolte 1876. L'hiver fut très-doux; il est possible que les germes disparaissent plus rapidement pendant les hivers rigoureux.

Résistance de certains germes à l'action d'une température de 100 degrés.
Conditions de leur développement.

Dans ces dernières années, beaucoup d'observateurs ont publié des travaux sur la résistance que présentent certains liquides organiques à l'action d'une température de 100 degrés. Dès 1862, M. Pasteur appelait l'attention sur ce fait que l'ébullition du lait ne le rend pas stérile, tandis que les autres liquides, l'eau de levûre de bière, l'urine acide, le moût de bière, le moût de raisin, se conservent sans altération après une ébullition de quelques instants. La cause de cette différence, d'après M. Pasteur, tient à ce que le lait a une réaction neutre ou légèrement alcaline, tandis que les autres liquides ont une réaction acide. Il en donne la preuve en montrant que, si l'on sature de l'eau de levûre par du carbonate de chaux, l'ébullition ne suffit plus pour la stériliser.

Ce fait est général, comme nous le verrons dans un instant. Tous les liquides organiques neutres ou légèrement alcalins donnent naissance à des organismes microscopiques, lors même qu'ils ont été portés à la température de 100 degrés, même pendant plus d'une heure. Ces organismes paraissent être les mêmes avec les différents liquides : au début, lorsque le trouble commence à se produire, ce sont des bâtonnets plus ou moins allongés et articulés, en général mobiles; puis ils viennent se rassembler à la surface du liquide, où ils forment un voile d'aspect gras et ridé et ayant une couleur grisâtre ou rougeâtre. L'examen microscopique d'un fragment de ce voile montre une multitude de petits corps un peu allongés, très-réfringents, de sorte qu'en faisant varier un peu la mise au point ils apparaissent brillants ou sombres; à ce moment, il n'y a plus que quelques rares bâtonnets immobiles. En faisant des prises fréquentes, il est facile de suivre la transformation; on voit alors les points allongés brillants se former dans l'intérieur des bâtonnets; bientôt la matière qui les réunit se résorbe et ils deviennent libres. Ces points brillants, placés dans des conditions convenables, donnent eux-mêmes naissance à des bâtonnets qui, après s'être reproduits pendant un certain temps par scissiparité, donnent à leur tour des points bril-

lants. C'est là un mode de génération de certains organismes qui a été décrit pour la première fois par M. Pasteur. Les points brillants sont donc pour ainsi dire les graines des bâtonnets; nous les appellerons des *spores*; quant aux bâtonnets eux-mêmes, nous leur donnerons le nom de *bacillus subtilis*, conformément à la classification adoptée par Cohn, le savant physiologiste allemand.

Le liquide sur lequel on a fait le plus d'expériences est l'eau de foin, qu'on obtient en mettant digérer de l'eau avec du foin pendant six heures à la température de 36 degrés environ. Les principaux observateurs qui ont fait des travaux avec ce liquide sont Cohn en Allemagne, Roberts et Tyndall en Angleterre.

W. Roberts a publié ses recherches dans un excellent Mémoire contenu dans les *Transactions philosophiques* de 1874.

Les expériences du professeur Cohn confirment celles du D^r Roberts quant à la résistance des infusions à l'action de la chaleur. Tant que la période d'ébullition ne dépassait pas quinze minutes, des organismes apparaissaient dans les infusions. Dans certains cas, soixante, quatre-vingts et même cent vingt minutes n'ont pas suffi. Il y a cependant une différence marquée entre les résultats obtenus par ces deux expérimentateurs. Tandis que le D^r Roberts trouve qu'une ébullition de cinq minutes est suffisante pour stériliser les infusions légèrement acides, le professeur Cohn ne trouve aucune différence dans la résistance des infusions, qu'elles soient neutres ou acides.

Le professeur Tyndall a publié, en 1877, un long Mémoire sur cette question; il trouve des résultats qui tantôt confirment, tantôt infirment ceux des deux observateurs précédents. La cause de ces différences, d'après lui, serait due à la nature du foin, sur lequel se trouveraient des germes plus ou moins résistants suivant que le foin serait plus ou moins vieux.

Je n'entreprendrai pas de décrire la manière d'opérer de chacun de ces observateurs; ils se sont surtout préoccupés de ne pas laisser rentrer de germes venant de l'air pendant le refroidissement et ont imaginé à cet effet des dispositions plus ou moins simples, mais assurément très-compliquées. Cette cause d'erreur, d'ailleurs, est loin d'avoir l'importance qu'ils lui ont attribuée.

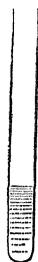
Mes expériences ont surtout porté sur l'eau de foin, l'eau de levûre

de bière, le moût de raisin et l'urine (¹). Ces liquides avaient quelquefois naturellement l'acidité ou l'alcalinité que je désirais; d'autres fois, je leur donnais cette acidité ou cette alcalinité en ajoutant des quantités convenables d'acide sulfurique ou de potasse étendus.

Je me suis d'abord occupé de la distinction à établir entre les liquides neutres ou légèrement alcalins et les liquides légèrement acides. Voici une des méthodes que j'ai employées et qui me paraît excessivement simple.

On introduit les liquides plus ou moins acides ou alcalins, et additionnés de spores d'une culture précédente (²), dans des tubes en verre étroits et forts, fermés par un bout (*fig. 24*). On ferme à la lampe

Fig. 24.



le côté resté ouvert. On agite les tubes de façon que toutes les parois soient mouillées par le liquide et on les plonge dans l'eau bouillante pendant dix minutes. Ce temps est suffisant pour que le liquide intérieur soit porté à la température de l'eau bouillante pendant plusieurs minutes. Il est bon d'agiter de nouveau les tubes pour mouiller les parois après sept ou huit minutes d'immersion. Dans ces conditions, toutes les fois que l'acidité des liquides était égale ou supérieure à 1 centimètre cube d'acide sulfurique normal décime pour 20 centimètres cubes de liquide (³), on ne voyait jamais apparaître

(¹) Je ferai remarquer que ce dernier liquide ne peut pas être employé lorsqu'on doit chauffer pendant longtemps, car l'urée qu'il contient se décompose sous l'action de la chaleur, de sorte que la réaction varie constamment.

(²) Cette addition de spores est nécessaire pour être certain que les liquides en fermentent.

(³) Ce qui correspond à 0^{sr},245 par litre.

d'organismes microscopiques; si, au contraire, les liquides étaient neutres ou légèrement alcalins, l'altération se manifestait très-rapidement.

Les résultats sont absolument les mêmes si l'on fait bouillir les liquides pendant deux minutes dans un *ballon flambé*.

Cette même expérience me montrait, en outre, quelle était la réaction des liquides s'altérant le plus facilement après l'action de la chaleur. Ces liquides étaient ceux qui étaient sensiblement neutres ou légèrement alcalins. Dès que l'alcalinité devient un peu notable, il n'y a plus de développement.

J'ai cherché ensuite à quelle température il fallait porter les tubes après leur sortie de l'eau bouillante pour que l'altération fût la plus rapide et la plus certaine. A cet effet, j'ai mis dans des étuves à 20, 32, 38, 44 et 50 degrés des tubes renfermant de l'eau de foin neutre additionnée de spores et retirés de l'eau bouillante après une demi-heure, une heure, une heure et demie, deux heures, etc.

J'ai trouvé que ceux qui s'altéraient le plus rapidement étaient les tubes placés dans l'étuve à 38 degrés. A 20 degrés, il n'y eut pas d'altération. A 32, 44 et 50 degrés, l'altération se produisait encore, mais moins rapidement. Quelquefois même, des tubes qui avaient été chauffés pendant très-longtemps s'altéraient à 38 degrés, tandis qu'ils ne s'altéraient pas aux autres températures. En remettant ces derniers tubes à 38 degrés, on constatait leur altération.

Par conséquent, pour avoir les conditions les plus favorables au développement des *bacillus*, il faut se servir de liquides neutres mis ensuite à l'étuve à 38 degrés.

Mais pendant combien de temps les spores placées dans des liquides neutres peuvent-elles résister à l'action de la température de 100 degrés?

Pour le savoir, je plonge les tubes dans l'eau bouillante et je les retire après des temps variables, une heure, deux heures, trois heures, etc., puis je les porte à l'étuve à 38 degrés. Ici les résultats sont différents suivant la nature du liquide. Celui qui m'a paru offrir la plus grande résistance est l'eau de levûre neutre, qui s'est altérée après cinq heures d'ébullition, puis l'eau de foin neutre, également après cinq heures, mais moins rapidement, le bouillon Liebig après trois heures, le moût de raisin neutralisé après une heure et demie. Ainsi, indépendamment

de la réaction au papier de tournesol, la nature même du liquide a une grande influence sur l'altération ultérieure. Après six heures d'ébullition, j'ai toujours eu la stérilité complète, mais il est possible que d'autres liquides présentent encore une plus grande résistance.

Une question très-importante se présente naturellement à l'esprit. L'eau commune renferme les germes de tous les organismes microscopiques; elle renferme donc des spores de *bacillus*, et, comme elle est neutre, on doit se demander si l'ébullition suffit à la priver de tous germes vivants, comme on l'a admis jusqu'ici. Pour le savoir, il fallait ensemercer de l'eau portée à 100 degrés pendant des temps variables dans des liquides neutres stériles.

Voici une expérience préliminaire destinée à m'indiquer la température que je devais atteindre pour que la stérilité fût certaine.

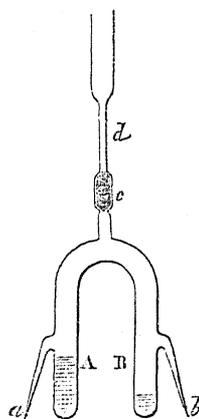
On plonge complètement dans le bain de chlorure de calcium des tubes étroits fermés aux deux bouts et contenant de l'eau de foin neutre additionnée de spores. On chauffe en ayant soin d'agiter constamment le bain de façon que la température soit uniforme.

On retire le 1 ^{er} tube lorsque la température est.....	100°
» 2 ^e » 4 minutes après, et la température est..	105
» 3 ^e » 6 » » »	108
» 4 ^e » 8 » » »	110
» 5 ^e » 10 » » »	112
» 6 ^e » 12 » » »	113
» 7 ^e » 15 » » »	115
» 8 ^e » 18 » » »	116

A ce moment, le bain dont je me servais commence à entrer en ébullition. Les tubes sont ensuite portés à 38 degrés. Au bout de deux ou trois jours les six premiers sont altérés, mais les deux derniers se sont conservés indéfiniment. Or, comme les tubes étaient chauffés en même temps que le bain, on peut admettre qu'ils avaient sensiblement la température du bain au moment où on les a retirés. Néanmoins, pour plus de sûreté, surtout en mettant les liquides dans des ballons, j'ai pensé qu'il était bon de les porter à la température de 115 degrés et même de les laisser pendant quelque temps à cette température. Dans ces conditions, tous les liquides neutres dont je me suis servi ont toujours été parfaitement stérilisés.

Revenons maintenant à l'expérience qui doit nous montrer si l'eau bouillie peut encore renfermer des germes vivants. On aspire le liquide neutre dans l'une des branches A d'un tube en verre à deux effilures flambé ACB (fig. 25) (1), puis on ferme l'effilure *a* à la lampe; dans l'autre

Fig. 25.



branche B on aspire une petite quantité d'eau additionnée de spores; on ferme l'effilure *b* à la lampe et l'on plonge les deux branches dans l'eau bouillante. On retire les tubes après des temps variables, une demi-heure, une heure, une heure et demie, deux heures, etc. Puis on fait passer une partie du liquide de la branche A dans la branche B. Le liquide qui reste dans la branche A sert de témoin pour s'assurer qu'il est bien stérilisé. En opérant ainsi, j'ai constaté qu'il se produisait des *bacillus* dans la branche B même après deux heures d'exposition à 100 degrés; mais, après trois heures, il n'y eut plus d'altération.

Les spores de *bacillus* placées dans l'eau distillée peuvent donc résister pendant plus de deux heures à la température de 100 degrés.

J'ai fait la même expérience en remplaçant l'eau additionnée de spores par de l'eau du robinet. Ici les résultats paraissent contradictoires. Tantôt il y avait altération avec des tubes qui avaient été chauffés

(1) En C se trouve du coton qui a été flambé en même temps que le tube. Le flambage se fait en mettant le tube dans un fourneau à gaz dont la température est de 150 à 200 degrés.

Ces tubes ont été disposés et utilisés pour la première fois dans les expériences que M. Pasteur a faites pour détruire les assertions du D^r Bastian.

pendant une heure, une heure et demie, tantôt des tubes chauffés pendant quelques minutes seulement restaient tout à fait stériles. Ces différences étaient surtout très-nettes lorsqu'on n'introduisait que très-peu d'eau. La cause saute aux yeux : l'eau, sous un petit volume, ne renferme pas nécessairement des spores du *bacillus subtilis*.

J'ai constaté d'ailleurs directement qu'en faisant bouillir de l'eau dans un ballon pendant une heure et plus, puis ajoutant un liquide neutre stérile, il se produisait des *bacillus*.

L'eau distillée prise dans les réservoirs ordinaires de nos laboratoires se comporte à peu près comme l'eau du robinet, et cela parce qu'elle a été recueillie dans des vases eux-mêmes lavés avec l'eau du robinet. L'altération a seulement lieu moins souvent. Mais, si l'eau distillée est recueillie dans des vases flambés, à l'abri des poussières de l'air, elle ne provoque jamais d'altération, lors même qu'elle n'a pas été chauffée, ainsi que l'ont constaté MM. Pasteur et Joubert.

Cette non-continuité des spores dans l'eau du robinet et l'eau distillée montre pourquoi il est nécessaire d'ajouter artificiellement des spores aux liquides sur lesquels on opère pour avoir des résultats comparables; sans cela, on pourrait avoir des infusions qui tantôt s'altèrent et tantôt se conservent, de sorte qu'on ne pourrait plus rien conclure. C'est pour cela qu'il faut dire que l'eau bouillie pendant très-longtemps PEUT ne pas être stérile, et que les infusions neutres ou légèrement alcalines s'altèrent *le plus souvent* après l'ébullition.

Peut-être est-ce là la cause pour laquelle le professeur Tyndall a obtenu des résultats contradictoires.

Mais alors il semble impossible de stériliser même des liquides acides par une simple ébullition dans des ballons non flambés, car il y a toujours des parois qui ne sont pas mouillées par le liquide acide et sur lesquelles peuvent rester des spores qui contagionnent ensuite le liquide. Cependant nous savons que les liquides notablement acides se conservent lorsqu'on les fait bouillir pendant quelques minutes dans des ballons non flambés. La cause de cette apparente contradiction est due à ce que les spores qui résistent à la température de 100 degrés se développent péniblement dans les liquides peu acides et même pas du tout si l'acidité est suffisante.

Que l'on prenne, en effet, des spores qui ont été portées à 100 degrés

pendant quelques minutes et qu'on les enseme dans des liquides stériles dont les acidités vont progressivement en augmentant à partir de la neutralité, et voici ce que l'on constate : dans les liquides où l'acidité est faible, c'est-à-dire lorsqu'elle est égale à 1 ou 2 centimètres cubes d'acide sulfurique normal décime pour 20 centimètres cubes de liquide, il y a développement; dans les autres, le liquide reste limpide. D'ailleurs, plus les spores ont été chauffées pendant longtemps et plus elles ont de difficultés à se développer dans les liquides légèrement acides. Ainsi, des spores portées à 100 degrés pendant une heure ne se sont pas développées dans un liquide dont l'acidité était 1 environ, tandis que des spores non chauffées se sont développées, quoique péniblement, dans un liquide dont l'acidité était de $2\frac{1}{2}$ à 3.

Ces résultats nous montrent la nécessité de flamber les vases dans lesquels on fait bouillir les liquides très-peu acides. C'est sans doute pour cela que le professeur Cohn ne trouve pas de différence sensible dans la résistance des infusions de foin, qu'elles soient neutres ou légèrement acides.

Après avoir constaté la grande résistance des spores placées dans l'eau distillée, j'ai voulu vérifier que ces spores placées dans l'eau légèrement acidulée étaient facilement tuées par la température de 100 degrés. A cet effet, je remplaçai l'eau ordinaire par de l'eau plus ou moins acide et je plongeai les tubes pendant dix minutes dans l'eau bouillante. Or, à ma grande surprise, je constatai que l'eau ayant une acidité de 2, 3, 4 et même 5 centimètres cubes d'acide sulfurique normal décime pour 20 centimètres cubes d'eau produisait encore une altération. Je répétai plusieurs fois l'expérience en la variant de différentes façons et j'obtins toujours le même résultat. Avec une eau plus acide, la stérilité fut complète.

Ainsi, l'eau dont l'acidité est inférieure à 5 n'est pas stérilisée par une immersion de dix minutes dans l'eau bouillante ou par une ébullition directe de quelques minutes dans un vase flambé. L'eau ne se comportait donc pas comme les autres liquides peu acides, car ceux-ci se conservent après qu'on les a fait bouillir dans un ballon flambé.

J'eus alors l'idée que peut-être ces liquides n'étaient pas privés de tous germes vivants, qu'ils renfermaient encore des spores actives, mais qui ne se développaient pas parce que le liquide était légèrement acide.

Et, en effet, en introduisant dans la branche B des liquides dont l'acidité était inférieure à 5 et additionnés de spores, puis plongeant le tube pendant dix minutes dans l'eau bouillante, enfin ensemençant une petite quantité du liquide de la branche B dans le liquide neutre stérile de la branche A, voici ce qu'on constate : au bout de quelques jours, toutes les branches A sont altérées (¹), tandis que toutes les branches B sont parfaitement limpides. Cette expérience a aussi été faite plusieurs fois avec différents liquides et de différentes façons.

Donc, les liquides légèrement acides bouillis ne sont pas stériles au vrai sens du mot, puisqu'ils renferment encore des germes vivants; leur conservation ne prouve qu'une chose : c'est que les germes qui n'ont pas été tués ne peuvent pas se développer dans ces liquides.

Enfin les *bacillus*, dont les spores offrent une si grande résistance à l'action de la chaleur, sont-ils des êtres aérobies ou anaérobies? Il était probable *a priori* qu'ils étaient aérobies, car ils ne donnent lieu à aucun dégagement de gaz pendant leur vie, et ils forment à la surface du liquide un voile ridé et mucoreux comme s'ils venaient tous pour absorber les dernières traces d'oxygène. Et, en effet, en faisant un vide parfait dans un tube, dans l'une des branches duquel on a aspiré un liquide neutre additionné de spores porté à 100 degrés pendant quelques minutes, puis fermant à la lampe en *d*, on ne constate aucun développement; si, au bout de plusieurs jours, on ouvre le tube en *d*, l'air rentre en filtrant sur le coton qui est en C, et l'altération se manifeste très-rapidement. Il est nécessaire que le vide soit très-bien fait dans le tube, car, s'il reste un peu d'oxygène, il se produit un léger développement qui s'arrête presque aussitôt faute d'oxygène; en laissant rentrer l'air, un nouveau développement très-abondant se produit.

Les *bacillus subtilis* sont donc des êtres aérobies.

Voici d'ailleurs une expérience qui montre bien la très-grande avidité de ces organismes pour l'oxygène. On introduit dans la branche A un liquide neutre stérile et dans l'autre branche B le même liquide additionné de spores. On ferme à la lampe le tube en *d* (²). Le développe-

(¹) Le liquide de ces branches avait été éprouvé auparavant, et l'on avait constaté qu'il était parfaitement stérile.

(²) Les effluves *a* et *b* sont toujours fermées à la lampe après l'introduction du liquide.

ment se produit dans la branche B. Au bout de quelques jours on ensemence la branche A, non altérée, avec une goutte du liquide de B; il ne se produit pas de développement et le liquide de A reste limpide, ce qui montre que tout l'oxygène renfermé dans le tube a été absorbé par les organismes de la branche B. En effet, en ouvrant le tube en *d* et laissant rentrer de l'air pur, le développement se produit très-rapidement.

Enfin, les germes du *bacillus subtilis* existent dans l'air. Je l'ai constaté en exposant des liquides neutres stériles dans des vases flambés au contact des poussières de l'air, mais ils sont en faible quantité par rapport aux spores des moisissures. Dans les manipulations des liquides neutres au contact de l'air, on a très-rarement l'occasion de constater la production accidentelle de ces organismes.

Le *bacillus subtilis*, introduit sous la peau d'un cochon d'Inde, ne produit aucune action.

En résumé :

1° Les liquides neutres peuvent être portés pendant très-longtemps à la température de 100 degrés sans être rendus stériles. Le temps nécessaire pour leur stérilisation est variable avec la nature du liquide. Une température de 115 degrés les stérilise complètement et très-rapidement.

2° Les liquides peu acides (ceux dont l'acidité est inférieure à 5 centimètres cubes d'acide sulfurique normal décime pour 20 centimètres cubes de liquide) se conservent lorsqu'on les fait bouillir dans des ballons flambés, mais ils ne sont pas stériles au vrai sens du mot, car ils peuvent encore renfermer des germes vivants qui se développent dans les liquides neutres.

3° L'ébullition de l'eau dans un appareil, même pendant plus d'une heure, peut ne pas être suffisante pour le priver de tous germes vivants.

4° Les *bacillus subtilis*, dont les germes offrent une si grande résistance à l'action de la chaleur, sont des êtres essentiellement aérobies; leur développement est le plus rapide et le plus facile dans les liquides sensiblement neutres et à la température de 38 degrés environ. Ils ne se développent pas du tout dans les liquides notablement acides.

Les conséquences à tirer de ces résultats sont très-importantes :

1° Toutes les fois qu'on voudra manipuler des liquides neutres stériles, il faudra se servir d'appareils flambés.

2° Toutes les fois qu'on voudra recueillir des liquides organiques neutres ou légèrement alcalins pour constater leur conservation, il faudra se servir de vases également flambés.

C'est sans doute parce qu'on se servait de vases qu'on croyait privés de germes par l'ébullition de l'eau qu'on n'était pas encore parvenu à conserver du lait naturel sortant du pis de la vache. J'ai constaté, en effet, que de l'eau, même bouillie pendant longtemps, introduite dans du lait stérile porté à 115 degrés, provoquait son altération. En prenant les précautions nécessaires pour éviter les germes de l'air et ceux pouvant exister sur le pis des animaux, nous avons vu que j'ai pu conserver dans des vases flambés du lait naturel exposé au contact de l'air pur pendant plusieurs mois sans voir apparaître le moindre organisme microscopique. Le sang et l'urine, qu'elle soit acide, neutre ou alcaline, recueillis directement dans des vases flambés, se conservent aussi sans altération au contact de l'air pur, ainsi que M. Pasteur l'avait déjà constaté.

Ces résultats vont aussi nous montrer très-clairement les causes d'erreurs commises par le D^r Bastian, de Londres, dans une expérience qui a eu un certain retentissement, et par laquelle il prétend avoir découvert les conditions physico-chimiques de la génération spontanée de certaines bactéries. Cette expérience consiste à neutraliser de l'urine acide bouillie par une dissolution de potasse portée à la température de 120 degrés. J'ai vu le D^r Bastian dans le laboratoire de M. Pasteur, et voici comment il opère : L'urine, recueillie d'abord dans un vase quelconque, est introduite dans une cornue, ainsi que le tube porté à 120 degrés renfermant la quantité de potasse nécessaire pour la saturation. On étire le col de la cornue, on fait bouillir l'urine directement pendant deux minutes, on ferme le col à la lampe, puis on retourne la cornue de façon que toutes les parois aient été en contact avec l'urine, et on la plonge dans l'eau bouillante pendant huit minutes. Après le refroidissement, on casse le tube renfermant la potasse par une secousse brusque, et l'on porte les cornues à

la température de 50 degrés. Au bout d'un jour ou deux, des *bacillus* apparaissent dans un certain nombre de cornues, mais pas dans toutes, ainsi que le reconnaît le D^r Bastian lui-même. Or, dit le D^r Bastian, l'urine acide bouillie ne renferme pas de germes, la potasse portée à 120 degrés n'en renferme pas non plus; donc les organismes qui ont apparu sont nés spontanément. On voit immédiatement la cause d'erreur. L'urine, étant recueillie dans un vase non flambé et mise dans une cornue non flambée, peut renfermer des spores de *bacillus*; l'acidité de l'urine est en général inférieure à 5 centimètres cubes d'acide sulfurique normal décime pour 20 centimètres cubes de liquide; d'ailleurs, si cette acidité est supérieure au début de l'expérience, elle devient plus faible après les deux premières minutes d'ébullition, et, par suite, lorsqu'on retourne la cornue pour la plonger dans l'eau bouillante, cette acidité n'est plus suffisante pour tuer les germes pouvant exister sur les parois qui n'ont pas encore été mouillées par le liquide. Si l'on ne brise pas le tube de potasse, ces germes ne se développent pas, parce que le liquide est encore acide, mais le développement a lieu dès que le liquide est rendu neutre. Aussi, si l'on répète l'expérience, ainsi que l'a fait M. Pasteur, en recueillant l'urine dans un vase flambé et l'introduisant dans une cornue flambée, il n'y a plus jamais production d'organismes (1). Voici une expérience que j'ai répétée plusieurs fois, et qui montre bien l'importance du flambage des appareils.

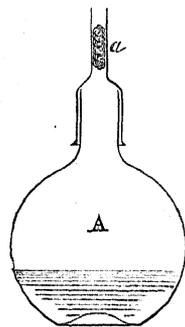
On recueille de l'urine acide dans une fiole flambée. A l'aide d'une pipette également flambée, on introduit le liquide dans une série de tubes flambés et non flambés qu'on ferme ensuite à la lampe et qu'on plonge dans l'eau bouillante pendant dix minutes après les avoir agités de façon à mouiller toutes les parois. Après refroidissement, et à l'aide d'une pipette flambée, on introduit 10 centimètres cubes de liquide de chacun des tubes dans une série de flacons flambés A (*fig. 26*) (2). Avec

(1) Voir *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. LXXXV, p. 178.

(2) Le bouchon de ces flacons, rodé à l'émeri, recouvre exactement le goulot des flacons; en *a* se trouve un tampon de coton, servant à filtrer l'air qui rentre dans l'appareil, par suite des variations de température. Ces flacons sont très-commodes pour la culture de tous les organismes aérobies.

une autre pipette flambée, on ajoute la quantité de potasse, portée à 115 degrés, nécessaire pour saturer exactement ces 10 centimètres cubes. On porte ces flacons à l'étuve, et au bout de deux ou trois jours on constate que *tous* les flacons qui ont reçu l'urine provenant des tubes flambés sont inaltérés, tandis que *tous* ou *presque tous* ceux qui ont reçu l'urine provenant des tubes non flambés sont altérés. Le petit nombre de ceux qui restent quelquefois inaltérés dans ce dernier cas est dû à ce que, par hasard, l'urine ne renfermait pas de spores, quoique ayant été mise dans des tubes non flambés (1).

Fig. 26.



En se servant d'appareils flambés, il n'est même pas nécessaire que l'urine soit notablement acide pour répéter l'expérience du D^r Bastian, et cela tient à ce qu'il y a très-peu de germes de *bacillus* dans l'air.

Une autre expérience très-simple, qui montre bien aussi l'influence du flambage des vasés, consiste à recueillir la même urine normalement neutre dans une fiole flambée et dans une autre non flambée. On fait bouillir les deux liquides pendant le même temps, et l'on constate que le liquide de la fiole non flambée s'altère très-vite, tandis que celui de la fiole flambée se conserve indéfiniment.

(1) C'est là une des causes pour lesquelles il y a toujours des cornues qui ne s'altèrent pas dans l'expérience du D^r Bastian; une autre cause est due à ce que, par l'ébullition, l'air est complètement chassé de la cornue.

La même expérience se fait très-facilement avec le lait sortant du pis de la vache, ce qui suffit, pour le dire en passant, pour prouver que les organismes qui se développent dans le lait bouilli ordinaire ne sont pas produits par quelque chose existant normalement dans ce liquide.

Les résultats qui précèdent vont aussi nous expliquer une expérience faite autrefois par MM. Pouchet, Joly et Musset, et invoquée par ces expérimentateurs pour soutenir la théorie de l'hétérogénie. Cette expérience consistait à faire bouillir de l'eau de foin dans un ballon effilé qu'on fermait à la lampe pendant l'ébullition. Le liquide se conservait alors intact. Mais si l'on venait à briser la pointe des ballons dans un endroit quelconque, et qu'on la refermât ensuite, on constatait la production d'organismes microscopiques. Par conséquent, il fallait, dans la théorie des germes et d'après ces observateurs, que l'air renfermât en tous lieux et sous un petit volume des germes de ces organismes, ce qui était évidemment une absurdité. M. Pasteur montra, devant une Commission nommée par l'Académie des Sciences, que, si l'on fait cette expérience avec de l'eau de levûre, il y a toujours un certain nombre de ballons qui restent inaltérés. MM. Pouchet, Joly et Musset ne voulurent pas répéter leur expérience devant la Commission, probablement parce qu'ils ne connaissaient pas les conditions exactes de sa réussite. Ce qui est certain, c'est que cette expérience est parfaitement exacte, et elle peut être répétée avec certitude; mais elle ne prouve absolument rien en faveur de la doctrine de l'hétérogénie. Les spores des organismes qui n'étaient pas tués ne se développaient pas, et l'eau de foin restait limpide, tout simplement parce que l'air avait été complètement chassé du ballon pendant l'ébullition; en brisant la pointe, on laissait rentrer de l'oxygène, et les spores des *bacillus*, inactives jusque-là, pouvaient se développer. Mais les germes de l'air n'avaient rien à voir dans ce développement; et, en effet, le même phénomène se produit si on laisse rentrer de l'air pur qui a filtré sur du coton roussi.

Le professeur Tyndall signale aussi, dans son dernier Mémoire, le fait que, dans une série de ballons d'eau de foin fermés à la lampe pendant l'ébullition, ceux qui s'altéraient ensuite avaient tous une pe-

tite fente à l'endroit de la fermeture. Il conclut que les germes de l'air ont passé à travers cette fente. Cela est possible, mais il est plus probable que la rentrée de l'air n'a agi que par son oxygène pour permettre aux spores non tuées de se développer.

Beaucoup d'autres faits, qui paraissent inexplicables au premier abord, trouvent une explication rationnelle par le résultat de ce travail.

