

De la variabilité dans les bacilles lactiques sous le rapport du pouvoir fermentatif.

Par

N.-P. Schierbeck.

(Laboratoire d'hygiène de l'Université de Copenhague.)

Notre détermination des diverses espèces microbiennes repose principalement sur les manifestations de l'activité vitale des microbes suscités dans nos différents milieux nutritifs. Si, par conséquent, les microbes sont soumis à une certaine variabilité par rapport à leurs propriétés biologiques, ce fait pourra nous rendre très difficile d'établir le diagnostic des diverses espèces microbiennes. Considérée sous ce point de vue, la question de la variabilité dans les microbes ne présente pas seulement le grand intérêt théorique qu'elle offrira toujours à tout naturaliste: elle est encore d'une importance toute particulière pour l'hygiéniste, constamment en présence de la tâche de chercher à découvrir dans la nature les différentes espèces de microbes, et dans des conditions où l'on pourrait particulièrement s'imaginer voir se produire une variation, si variation il y a.

Or, en examinant de plus près ce que nous a fourni jusqu'ici la littérature spéciale pour nous renseigner sur la variabilité dans les microbes, on ne tardera pas à constater

que sur ce domaine il faut distinguer les uns des autres, avec précision, trois phénomènes.

C'est ainsi que telle fonction peut se manifester avec plus ou moins de force selon le liquide nutritif où l'on cultive le microbe. De même, l'influence de quelque agent destructeur pourra atténuer temporairement cette manifestation, qui pourra d'autre part revenir vite à ses proportions premières lorsque cet agent destructeur cesse de fonctionner. Ces deux formes de variation ont été, l'une et l'autre, si souvent et si sûrement constatées sur tant de points des fonctions vitales de la cellule microbienne, qu'on ne saurait plus révoquer en doute et leur apparition et leur extension générale.

Par contre, il en est autrement de la troisième forme de variabilité, forme qui est en même temps la plus importante, à savoir le cas où l'atténuation ou l'exaltation d'une fonction, dues à l'action extérieure, se maintiennent invariables à travers des générations après que l'action extérieure a cessé. Cette dernière forme n'a été constatée avec certitude que pour un petit nombre de fonctions, tout particulièrement pour le pouvoir pathogène et la fonction chromogène. En ce qui concerne d'autres fonctions et tout spécialement le pouvoir de ferment, il y a bien quelques savants qui admettent la production de cette forme, tandis que tels autres la nient. D'ailleurs, la littérature bactériologique ne présente qu'un très petit nombre d'expériences sur les variations du pouvoir fermentatif. Cela est fort étrange, puisque c'est précisément l'étude de cette fonction qui sous plusieurs rapports, et en vue d'élucider la délimitation et la nature de la variabilité, offre des avantages beaucoup plus grands que ne le font les autres fonctions. Car, d'un côté, l'activité physiologique dont il est question ici, produit une manifestation qui se laisse déterminer quantitativement avec une tout autre précision et dont les nuances se laissent par conséquent poursuivre avec plus de facilité; de l'autre côté, nos recherches sur le pouvoir fermentatif nous font faire, pour

ainsi dire, un pas de plus vers cette question, en ce sens qu'ici nous pouvons offrir à nos races microbiennes le principe nutritif constituant l'irritant adéquat de l'activité qui fait l'objet de nos recherches.

Toutefois, comme nous venons de le dire, on ne dispose, sur ce terrain, que d'un très petit nombre de recherches. A proprement parler, les différents aperçus datant de ces dernières années sur ce qui concerne la variabilité dans les microbes, ne citent que quatre travaux à titre de preuves d'une baisse constante du pouvoir fermentatif des microbes. L'un de ces ouvrages comporte les recherches faites par M. Grotenfeldt¹⁾ sur les bacilles lactiques; mais la baisse du pouvoir fermentatif qu'on y constate ne semble être que tout à fait passagère. En tout cas, les recherches publiées ne laissent pas voir si, par une inoculation de lait en lait, l'affaiblissement constaté a pu se maintenir invariable à travers des générations. Les deux autres travaux²⁾ relatent la constatation d'un affaiblissement soi-disant constant du pouvoir fermentatif du *bacillus coli*. Cependant, des recherches postérieures³⁾ n'ont pas confirmé ce prétendu fait, et les vastes et excellentes études qu'a faites M. C.-O. Jensen⁴⁾ sur les fermentations des types *coli* ne portent pas non plus à croire à la probabilité d'une variabilité constante dans le pouvoir de ferment de ces microbes. Reste donc seulement la baisse constante de la fermentation nitrique, constatée, dans certaines conditions, par M. Winogradsky dans ses études sur les *ferments nitriques*.

C'est ainsi que, d'après les données actuelles, il semble y avoir lieu de reprendre la question de la variabilité du pouvoir fermentatif, afin de mettre éventuellement au jour de nouveaux faits servant à la question de savoir si, oui ou non, une varia-

¹⁾ *Fortschr. d. Med.*, 1889.

²⁾ Rodet: *De la variabilité*. — Malvoz: *Recherches bact. sur la fièvre typh.*

³⁾ Villinger: *A. f. Hyg.*, vol. 21.

⁴⁾ *Biolog. Selsk.s Forhandl.*, 1897—98.

tion du pouvoir de ferment des microbes en général, variation continuée à travers des générations, se laisse susciter par voie expérimentale.

Or, les recherches qu'on va lire ont eu pour but de résoudre ce problème, tandis que, jusqu'à nouvel ordre, la constatation des lois spéciales de l'apparition d'une variation éventuelle ne rentre pas dans le cadre de ces expériences.

J'ai choisi, en vue de ces recherches, les bacilles lactiques, parce qu'ici la manifestation de la fermentation se laisse déterminer avec beaucoup de facilité par un simple dosage de l'acidité. Toutefois, avant que ces microbes pussent servir à une étude des variations du pouvoir fermentatif, il fallait d'abord examiner davantage la marche même de la fermentation dans des conditions différentes. C'est pourquoi je dois commencer par rendre compte des recherches entreprises à ce sujet.

Le bacille lactique sur lequel j'ai opéré, a été isolé d'un lait spontanément coagulé. Dans tous les divers échantillons de lait que j'ai analysés ici à Copenhague à différentes époques de l'année, j'ai toujours trouvé un petit bacille court que son grand pouvoir fermentatif et sa fréquence dans le lait coagulé devraient plutôt faire regarder comme le bacille essentiel de l'acide lactique dans cette ville.

Comme on vient de le dire, ce microbe se présente, morphologiquement parlant, comme un bacille court et ovale, qui est immobile et se laisse facilement colorer, même suivant la méthode Gram. Il forme fréquemment, à la surface du gélose glycosé, des chaînettes de 3—5, voire même de plusieurs éléments, et rappelle fortement, dans des préparations qui en résultent, un type allongé de streptocoque, comme aussi, sur nos milieux nutritifs ordinaires, il pousse à peu près à l'instar des streptocoques.

La culture sur gélatine et sur plaques de gélose ne donne que des colonies peu importantes sous forme de points.

Ce microbe se développe parfaitement sur gélose sucré.

Au bout de 1—2 jours après la dissémination, on voit surgir, au fond, de petites colonies, rondes, fusiformes, jaunâtres, de la grosseur d'une tête d'épingle, épaisses, granuleuses, et, à la surface, de petites colonies humides et arrondies, souvent à bord sinueux, et qui par transparence, donnent des reflets de teinte bleuâtre irisée.

Par la piqûre sur gélatine, on n'obtient aucune croissance à la surface, et la gélose en piqûre n'en donne que des traces, tandis que, le long du canal de la piqûre, on obtient, dans les deux milieux, une croissance linéaire assez bonne, se détachant vers le bas en développement de colonies.

La culture en bouillon ne donne qu'une maigre croissance au fond du verre. Dans du bouillon ordinaire, les microbes ne pullulent que vers 30°, et, à trente et quelques degrés, les microbesensemencés périssent même au bout de quelques jours. Si, au contraire, on additionne de lactose ou de glycosé ce même bouillon, les microbes se développent parfaitement jusque vers 42°. On voit donc que le milieu nutritif peut être d'une grande importance pour juger la température maxima des microbes, point auquel on n'a jusqu'ici donné que fort peu d'attention. En même temps, ce qu'on vient de constater fournit un exemple qui montre assez bien quelle peut être l'importance de telle substance nutritive pour la résistance opposée par un organisme à une influence nocive.

Or, semés dans du lait, ces microbes donnent de l'acide et, au bout d'environ 24 heures, à près de 30°, la précipitation d'un coagulum mou et blanc sans bulles gazeuses ni excréation de petit-lait. Par conséquent, pour l'aspect et les conditions de croissance, ces microbes ressemblent beaucoup à ceux que MM. Thierfelder et Günther ont trouvés dans le lait de Berlin, ainsi qu'à plusieurs des types décrits par MM. Storch et Jensen.

Étudions maintenant davantage l'étendue et la marche de

la fermentation lactique que, dans des conditions différentes, ces microbes font subir au lait. On peut employer ici comme jalon la teneur en acide formée dans le lait, teneur qui se laisse aisément déterminer par un titrage avec la soude déci-normale. Dans ce qui va suivre, l'acidité est exprimée partout en centimètres cubes de soude déci-normale, employée pour saturer 100^{cc} de lait avec de la phénophtoléine comme indicatrice. De cette manière, on trouvera l'acidité du lait récemment trait exprimée comme étant égale à 15—16.

Or, semés dans du lait, les bacilles lactiques en question y suscitent une acidité dont la marche varie beaucoup suivant la température à laquelle on place le lait, ainsi que le montreront la table I et la courbe I ci-dessous, par exemple, pour les températures de 35° et 28°.

Si nous regardons maintenant la marche de la courbe de fermentation, par exemple, à 35°, elle nous apprend que pendant les 2 ou 3 premières heures, l'acidité se maintient invariable, après quoi elle commence à monter, et monte rapidement jusque vers la 15^e heure, puis plus lentement jusque vers la 36^e heure environ, moment où le maximum de l'acidité est atteint, ou peu s'en faut. C'est que, à partir de ce temps, la courbe se maintient pour ainsi dire parallèle à la ligne des abscisses. Quand une certaine acidité, déterminée pour chaque température, a été atteinte, soit 88—90 à 35°, la fermentation cesse, probablement parce qu'alors les microbes ne sont plus à même de surmonter l'action dysgénésique des acides produits. A 35°, la coagulation spontanée du lait s'effectue lors des 11^e—12^e heures, et à une acidité d'environ 58—60. Comme il ressort des courbes, il s'écoule quelques heures avant que commence l'acidification, état constaté déjà par Plant¹⁾, qui l'a appelé stade de l'incubation.

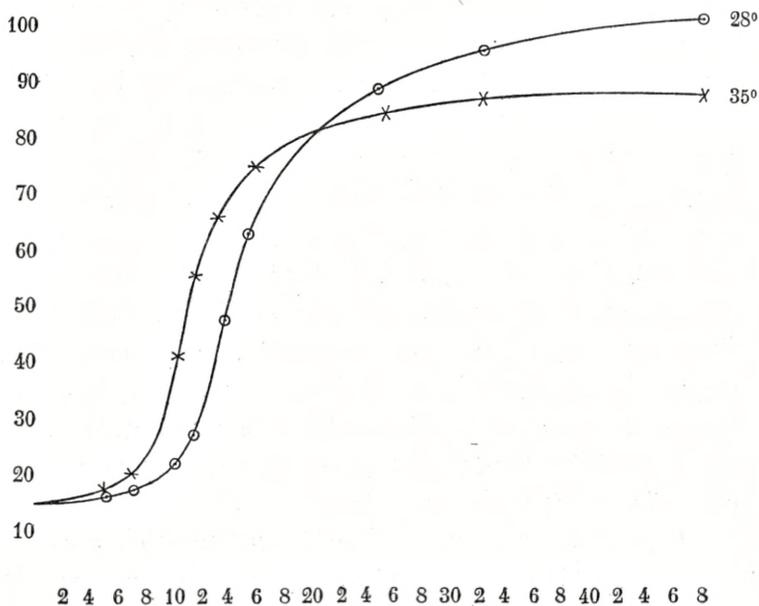
Or, à toutes les autres températures, j'ai trouvé ce stade

¹⁾ *Z. f. Hyg.* XV.

Tab. I et Courbe I.

L'acidité du lait.

Heures après l'ensemencement.	35°	28°
0	15	15
5	17	16
7	20	17
10	41	22
11	56	28
13	66	44
15	75	64
25	84	88
32	87	96
48	88	101



plus prolongé qu'à environ 35° , c'est-à-dire que la fermentation commence plus tard, en même temps qu'elle avance plus lentement. Par contre, à des températures inférieures à 35° , elle atteint une cote absolument plus élevée, soit environ 101 à 28° , et environ 110 à 18° ; toutefois, ces maxima ne sont atteints que plus tard, ainsi, à 28° , dans la 48^e heure seulement, et, à 18° , au 6^e jour seulement. On constate également une marche plus lente de la fermentation à toutes les températures supérieures à 35° , températures qui permettent encore le développement des microbes, et ici le maximum de l'acidité est moins élevé qu'à 35° . Par conséquent, la température optima de ces bacilles lactiques, à l'égard de la vitesse avec laquelle s'effectue la fermentation, se trouve à 35° .

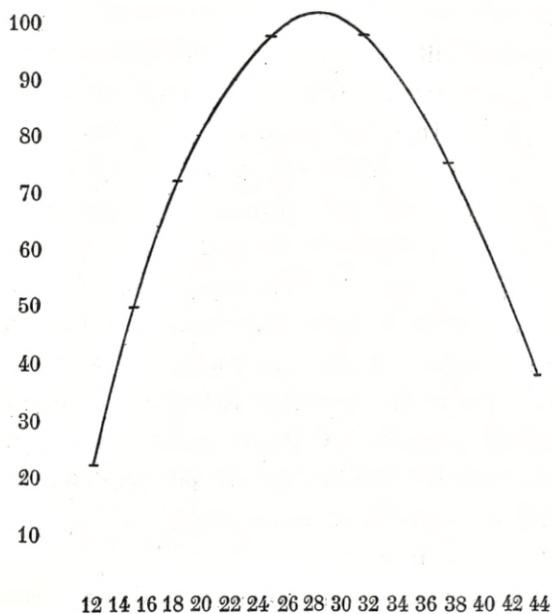
Par contre, à l'égard de l'intensité absolue atteinte par la fermentation, on trouvera une température optima différente suivant le temps de la marche de la fermentation, où l'on fait l'analyse: si on la fait au bout de deux jours, on trouvera les acidités ci-dessous (Tab. II) comme expressions de l'intensité de la fermentation aux températures différentes, et ici la temp. optima est à 28° . La représentation graphique de ces valeurs donne la courbe régulière ci-dessous, du 3^e degré (Courbe II). Mais si l'on fait déjà l'analyse à la 15^e heure environ, la temp. optima en question coïncidera avec l'optimum de la vitesse; si, au contraire, on ne fait l'analyse qu'au 6^e jour, la temp. optima se trouve à 18° , et c'est à cette dernière température que la fermentation atteint en somme sa plus grande extension. A des températures plus basses qui ne devraient pas s'opposer à la présence d'une acidité plus élevée encore, la fermentation ne dépasse pas toutefois le point atteint à 18° ; sans doute, parce que l'énergie de fermentation de ces microbes est on ne peut plus faible à ces températures basses.

Il y a donc, analogues à chaque température que comporte la zone végétative de nos microbes, d'un côté, une marche tout à fait déterminée de la fermentation, et, de l'autre, un

Tab. II et Courbe II.

L'acidité du lait après 2 jours.

Temp.	Acidité.
12	22
15	50
18	73
22	89
25	98
26	100
28	102
30	101
31	99
35	88
37	81
44	38



maximum déterminé de fermentation, atteint au bout d'un temps déterminé. En outre, chez les bacilles lactiques, il faut distinguer deux températures optimales, une par rapport à la vitesse de la fermentation, une autre, à l'égard de l'intensité absolue atteinte par la fermentation. Aussi, les différentes indications fournies par la littérature spéciale sur les températures optimales des bacilles lactiques, températures trouvées tantôt à près de 28°, tantôt à environ 35°, n'entraînent-elles pas la nécessité de vouloir dire qu'il se soit agi là d'espèces différentes de bacilles lactiques: ces indications peuvent être dues à ce seul fait qu'on a déterminé la température optima tantôt au moyen de l'extension de la fermentation, au bout d'un certain temps, tantôt sur la base de la vitesse avec laquelle la coagulation du lait s'est produite.

Or, la première question qu'il était ensuite désirable d'élucider en vue de l'étude ultérieure de la variabilité, devait être de savoir si cette intensité de la fermentation, correspondante à chaque température, se maintiendrait invariable après des repiquages faits dans du lait à la même température, fait que firent constater les recherches. C'est ainsi que, si l'on pratique, par un repiquage quotidien de lait en lait, une série de cultures, p. ex. à 35°, et si l'on analyse ces échantillons de lait au bout de deux jours environ, par conséquent après la cessation de la fermentation, on leur trouve à tous la même acidité. Si, par exemple, dans la première culture, l'acidité est 88, on ne la trouve oscillant, dans toute la série, qu'entre 86 et 89, par exemple. A 28°, on trouve de même à tous les échantillons une acidité d'environ 102, à 37° d'environ 81 pour tous, et ainsi de suite. A 28° et à 35°, on a poursuivi par mois cette analyse sans qu'on ait pu constater la moindre modification du degré de fermentation.

Il s'ensuit de là que

1° Le pouvoir fermentatif des bacilles lactiques considérés se laisse mesurer au moyen de l'acidité suscitée, au bout d'un

certain temps, dans du lait maintenu à une certaine température, et que

- 2° On pourra constater dans le pouvoir fermentatif de ces microbes une variation tant temporaire que permanente en étudiant l'acidité d'une série d'échantillons de lait ensemencés successivement et analysés au bout du même laps de temps, tant avant qu'après l'action sur les microbes de l'agent dont on veut contrôler l'influence.

De plus, ces recherches font ressortir que

- 3° La température et le moment d'analyse les plus convenables seront respectivement 35° et le second jour.

Les acidités survenues à des températures différentes et citées ici à titre d'exemples, se rapportent à celui des types isolés sur lequel on a particulièrement opéré dans ce qui va suivre. Toutefois, on peut, tant d'un seul et même échantillon de lait que de différents échantillons spontanément coagulés, isoler des bacilles lactiques possédant, au point de vue de la morphologie et de la culture, exactement les mêmes propriétés que celle qu'on vient de décrire, et y correspondant de même par rapport à l'intensité relative et à la marche de la fermentation aux températures différentes, mais non au contraire par rapport à l'intensité absolue de la fermentation. C'est que cette dernière intensité peut être tantôt plus basse, tantôt, bien que moins souvent, plus élevée.

C'est ainsi que, si nous isolons d'un seul et même échantillon de lait une série de bacilles lactiques, et si nous semons ces derniers dans du lait stérilisé, placé à 35°, nous pourrions trouver qu'au bout de 48 heures tous les échantillons de lait ensemencés ont une seule et même acidité, ou bien, comme ci-dessus, 88—90, ou bien une autre acidité depuis environ 50 jusqu'à 100; mais nous pourrions trouver aussi que quelques-uns ont une acidité de 88, d'autres une de 80, par exemple, encore d'autres une de 75, etc.

Quelques-uns des échantillons de lait pourvus des acidités les plus basses, diffèrent peut-être encore les uns des autres en ce que l'acidité peut bien être identique pour tous au bout de 48 heures, p. ex. 65; cependant, l'intensité fermentative révèle sa diversité par le fait qu'au bout de 24 heures seulement quelques-uns de ces échantillons se trouvent coagulés, tandis que d'autres ne se coagulent qu'à un moment donné de la seconde journée. Or, en continuant de cultiver de lait en lait ces différents microbes à fermentation moins forte, on voit se présenter l'un de ces deux cas: ou bien l'acidité monte, dès le second, tout au plus le 3^e repiquage, jusqu'à une cote assez élevée, ordinairement 88—90 environ, pour se maintenir invariable, cas où ces microbes se montrent comme des types affaiblis relativement seulement, ou bien l'acidité se maintient invariablement basse à travers une longue série de générations, c'est-à-dire aussi loin qu'on l'a poursuivie chaque fois, pour la part de quelques types dans environ 70 repiquages. Or, ces microbes se comportant tout à fait identiquement au point de vue morphologique et sous leurs autres rapports de culture, il est très naturel d'admettre que nous voilà en présence de races surgies naturellement d'un même microbe. Cette hypothèse trouve une nouvelle corroboration dans le fait qu'à plusieurs reprises on a constaté des phénomènes tout à fait identiques dans des cultures provenant des divers individus constituant cette même colonie. Nous citerons à titre d'exemple l'observation suivante.

On fit, d'un échantillon de lait spontanément coagulé, une série de cultures dans le lait, accusant toutes, au bout de 48 heures, une acidité d'environ 90. A partir de la 10^e culture, on ensemença dans du bouillon glycosé, dont, au bout d'environ 12 heures, on fit l'ensemencement sur plaques. Ici, comme en général dans tous les ensemencements sur plaques mentionnés dans ce travail, on a toujours inséré une ou plusieurs cultures de bouillon glycosé, d'où l'on a fait l'ensemencement pendant

que la culture était encore toute jeune, vieille de 12 heures à peu près, puisque, par des raisons aisées à comprendre, il se trouvait impossible d'obtenir sûrement des cultures pures sur plaques par l'ensemencement direct du lait. Parmi les colonies de bacilles lactiques obtenues par ce genre d'ensemencement, la majorité se trouvait faire fermenter le lait jusqu'à une acidité d'environ 75, à 35°. Une seule colonie fit fermenter le lait jusqu'à 90, et ces degrés de fermentation se maintinrent invariables dans les 10 repiquages où on les poursuivit. A partir du 10^e repiquage du type faisant fermenter le lait jusqu'à 90, on reprit l'ensemencement sur bouillon glycosé. Parmi les colonies obtenues de la sorte, on en analysa 20, dont il y eut une (*a*) faisant fermenter le lait jusqu'à 90, 16 (*b*) le faisant fermenter jusqu'à 75, — toutes à coagulation dans les 24 premières heures —, 2 (*c*) le faisant fermenter jusqu'à 69—70, également à coagulation pendant les 24 premières heures, et une (*d*) le faisant fermenter jusqu'à 66, mais où la coagulation ne se produisit que dans la 2^e journée. Au repiquage continué dans le lait, ces degrés de fermentation se maintinrent constants dans les 10 cultures analysées. Puis on reprit l'ensemencement du type (*a*), de 2 des types (*b*) et de (*d*). Les colonies obtenues alors du type (*d*), dont 20 furent analysées, se trouvèrent toutes faire fermenter le lait, à l'instar du type-mère. Il en fut de même des colonies provenant de l'un des types (*b*), tandis que, parmi les colonies résultant du second des types (*b*), il y en eut une analogue à (*d*), et, parmi les colonies issues de (*a*), il s'en trouva une comme (*a*), 14 comme (*b*), 3 comme (*c*) et 2 comme (*d*). Comme, dans ce cas, il ne s'agissait pas de trouver les lois de l'apparition de la variation, on ne poussa pas plus loin les recherches, tandis qu'on étudia plus en détail les trois types obtenus (*a*), (*b*) et (*d*) sous les rapports ci-dessous. La culture sur plaque fit donc déterminer la rapidité de croissance dans le lait de ces trois cultures, ce qui fit trouver, au bout de 24 heures, pour

(a)	une	augmentation,	de	4300
(b)	»	»	»	3400
(d)	»	»	»	2900.

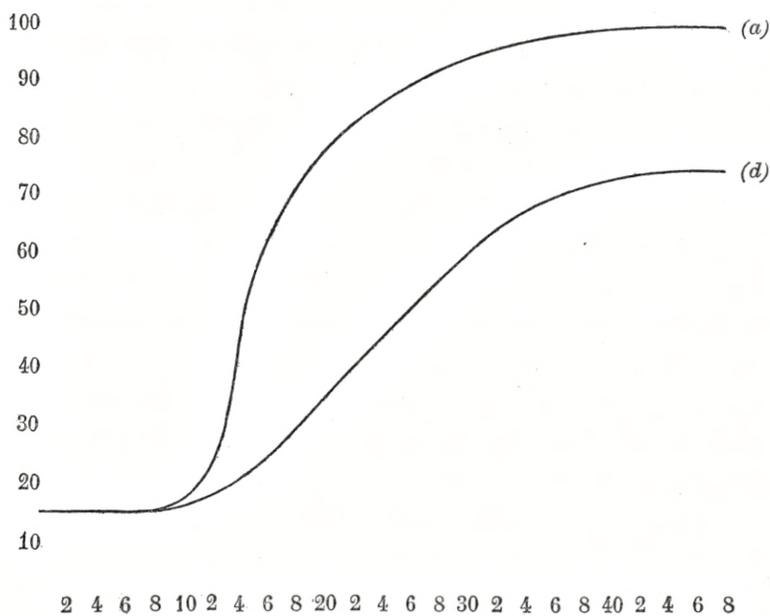
Par conséquent, une moins grande rapidité de croissance correspond au degré plus bas de fermentation; de même, la fermentation a une marche relativement plus lente, faits ressortant des tabl. et courbe III, qui représentent la marche de la fermentation des types (a) et (d) à 28°. Cela cadre avec la conception des cultures à fermentation moins forte comme types affaiblis de (a).

Mais d'autre part, la plus grande croissance de (a) semble mal cadrer avec l'apparition relativement rare de ce type parmi les colonies examinées. En effet, on devrait croire que, si ce type pullule beaucoup plus vite que ceux dont la fermentation est plus faible, on devrait aussi trouver, plus fréquemment que ce n'était le cas, aux colonies obtenues, comme ici, après 12 heures de croissance, une fermentation forte. Le fait que, par contre, on rencontrait relativement moins souvent le type à forte fermentation, trouverait donc plutôt son explication dans la réceptivité plus forte de ce type-là pour certaines actions extrinsèques. Afin d'arriver à savoir s'il existerait effectivement une pareille réceptivité plus forte pour des agents extérieurs ou une moindre résistance à ces mêmes agents, on cultiva, dans du lait additionné de doses différentes d'une solution de phénol à 3 p. c., les types (a), (c) et (d). Le résultat se trouve représenté dans les Tab. et Courbe IV, dont il ressort qu'on voit se produire, parallèlement à un pouvoir fermentatif plus accentué, une moindre résistance à certaines actions extrinsèques, dans le cas présent le phénol, tandis que les types au pouvoir fermentatif affaibli et à l'énergie de croissance réduite opposent une plus grande résistance à une seule et même action nocive.

Tab. III et Courbe III.

L'acidité du lait. 28° C.

Heures après l'ensemencement.	<i>a.</i>	<i>d.</i>
12	24	18
14	44	22
15	58	24
17	68	28
19	76	32
22	83	40
25	88	50
48	100	75



Passons maintenant, après ces recherches préparatoires sur la biologie des bacilles lactiques, à un compte rendu plus détaillé des expériences faites en vue de susciter empiriquement, si possible, une variation du pouvoir fermentatif de ces microbes. Il s'agit tout d'abord, dans une pareille recherche, de choisir pour point de départ une culture parfaitement homogène, c'est-à-dire une culture pure dont les colonies constituantes dans la culture sur plaque accusent toutes la même intensité fermentative à travers bon nombre de repiquages. A cet effet, j'ai choisi, parmi les types les plus communément rencontrés, celui ayant la plus forte fermentation, c'est-à-dire celui qui, au bout de 48 heures et à 35°, accusait dans le lait une acidité d'environ 90. A de rares intervalles, on l'a dit plus haut, ce type a été isolé dans des conditions naturellement inhomogènes, mais, règle générale, on trouvait les cultures isolées tout à fait homogènes, au moins après un petit nombre de repiquages dans du lait.

Or, chez ce type, comme d'ailleurs chez tous les autres types examinés, on n'eut pas de peine à susciter une réduction passagère du pouvoir de ferment, analogue à celle qu'on a antérieurement tant de fois constatée, c'est-à-dire une réduction qui se reperd après 1 ou 2 repiquages dans du lait. Cet affaiblissement relatif du pouvoir fermentatif se produisait toujours à un certain stade de toutes les vieilles cultures, tant dans le lait que dans la gélatine et le bouillon, et se déclarait d'autant plus vite que la température à laquelle étaient placées les cultures, était plus élevée. Comme l'ont aussi noté MM. Jensen et Storck, cet affaiblissement tenait à un affaiblissement de la culture dû aux produits d'assimilation et de dissimilation qui s'étaient formés.

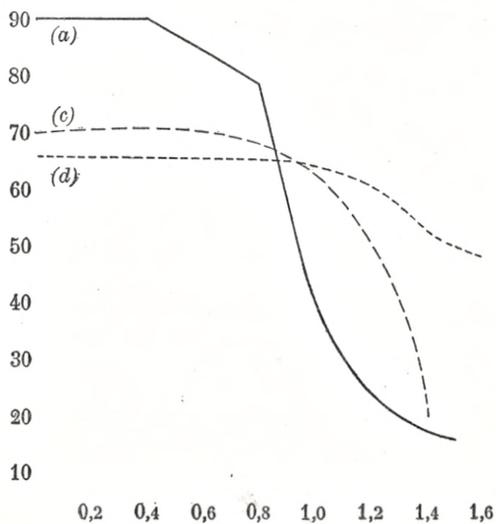
Ensuite, pour faire naître éventuellement une réduction permanente du pouvoir fermentatif, on essaya d'abord l'action d'une culture continuée pendant un assez long temps sur un milieu exempt de sucre, tel que le bouillon Cibil ou la gélatine

Tab. IV et Courbe IV.

L'acidité après 2 jours.

15^{cc} de lait + centimètres
cubes d'une solution de
phénol à 3 p. c.

0	90	70	66
0,4	90	71	65
0,6	84	70	66
0,8	79	68	66
1,0	40	64	64
1,2	25	51	61
1,4	16	20	52
1,6	16	19	48



Cibil, afin d'accoutumer par ce procédé les microbes à une vie sans pouvoir de ferment. Toutefois, cet artifice de culture fut tout à fait sans action sur le pouvoir fermentatif, tout au moins pendant les trois mois où l'on fit ces expériences. En effet, au bout de ce temps, pendant lequel on fit en tout 100 repiquages, les bacilles, semés dans du lait, donnèrent, dès le premier échantillon de lait, exactement la même fermentation que précédemment.

Parmi les moyens qui, dans d'autres recherches, se sont montrés particulièrement aptes à susciter des variations dans les propriétés biologiques des microbes, on peut citer surtout des solutions étendues d'acide phénique: aussi ai-je cherché à influencer, par cette voie, sur le pouvoir fermentatif en faisant des cultures dans du lait carbolisé. On étudia d'abord la fermentation provoquée par la culture employée dans du lait additionné de doses différentes de phénol. En voici le résultat:

15 ^{cc} de lait + centimètres cubes d'une solution de phénol à 3 p. c.	Acidité obtenue au bout de 48 heures.
0	90
0,4	88
0,6	84
0,8	76
1,0	55
1,2	32
1,4	22
1,6	17
1,8	15

Ce résultat nous fit choisir 0^{cc},9 d'une solution de phénol à 3 p. c. avec 15^{cc} de lait comme une concentration convenable pour un liquide continué de culture. On fit la culture à 35° et en repiquant quotidiennement de lait phéniqué en lait phéniqué. Comme d'ordinaire on examinait l'acidité au 2^e jour. Le tableau schématique ci-dessous donne le résultat de ces expériences:

Culture primitive à 35° — Acidité, 2^e jour — 90.

10 cultures dans du lait phéniqué.

Acid. moyenne — 67.

10 cultures dans du lait phéniqué.

Acid. moyenne — 60.

Dans du lait ordinaire
à partir de la 10^e
cult. : 1^{re} cult. — 75;
2^e cult. — 90.

10 cultures dans du lait phéniqué

Acid. moyenne — 59.

Dans du lait ordinaire
à partir de la 20^e
cult. : 1^{re} cult. — 74;
s'élève durant 15 cult.
jusqu'à 80; se main-
tient à 80 durant les
15 cult. successives,
c.-à-d. aussi loin
qu'on l'a étudiée.

15 cultures dans du lait
phéniqué.

Acid. moyenne — 60.

Dans du lait ordinaire
à partir de la 30^e
cult. : 1^{re} cult. — 65;
est poursuivie à tra-
vers 20 cult., et se
maintient à 65.

Dans du lait ordinaire
à partir de la 45^e
cult. : 1^{re} cult. — 65;
est poursuivie à tra-
vers 50 cult., et se
maintient à 65.

On observait toujours le degré de fermentation de la culture primitive dans des échantillons parallèles du lait servant d'ensemencement du lait phéniqué, et l'on constatait toujours un même degré de fermentation, soit environ 90.

Ensuite, partant des cultures de phénol, on fit de temps à autre des ensemencements dans du bouillon glucosé, et l'on examina les colonies isolées. On constata par là que la culture homogène¹⁾ primitive ne tardait pas à perdre cette homogénéité; car peu à peu un nombre croissant de colonies accusèrent des degrés de fermentation plus bas, et c'est par cette voie, conséquemment en isolant les divers individus, qu'on aboutit à des types affaiblis d'une manière permanente et analogues à ceux dont nous avons parlé ci-dessus et qui se trou-

¹⁾ Il faut prendre ici le mot *homogène* en ce sens que toutes les colonies — en tout 60 environ — analysées dans trois cultures successives sur plaque accusèrent la même fermentation, soit d'environ 90.

vaient dans les cultures par grandes masses; seulement, cet affaiblissement s'était déclaré à un stade bien antérieur. C'est ainsi que, tandis que la 3^e culture était encore essentiellement homogène, cette homogénéité se trouvait brisée dès la 6^e culture. Sur 10 colonies analysées, provenant d'un ensemencement qu'avait fourni cette culture, 6 fermentaient comme la primitive, 1 se montrait passagèrement affaiblie, 3 affaiblies d'une manière relativement permanente, avec un degré de fermentation de 80 se maintenant invariable dans 10 repiquages. Dans la 20^e culture de phénol, sur 10 colonies, on n'en trouva plus aucune semblable à la primitive; on en trouva 7 à un degré de fermentation d'environ 80, 3 d'environ 72, toutes constantes à travers 10 repiquages. Dans la 35^e culture de phénol, plusieurs colonies figurèrent avec un degré de fermentation de 49—50 seulement, cultures où le lait ne se coagulait pas. Si par conséquent on n'avait eu que la coagulation du lait pour critérium de la fermentation, on aurait refusé tout pouvoir fermentatif à ce type.

L'aperçu schématique ci-dessus, ainsi que le résultat fourni par les ensemencements, ont été cités ici à titre d'exemples des expériences qu'on a faites, et qui ont toutes donné un résultat parfaitement similaire.

Donc, cette culture dans du lait phéniqué nous a permis de faire naître des cultures nouvelles qui, cultivées ultérieurement dans le lait ordinaire, y suscitent un degré de fermentation très variable, degré inférieur à celui de la culture primitive et qui se maintient constant à travers une longue série de générations. En même temps, ces cultures se comportent tout à fait identiquement sous le rapport d'aspect microscopique et de croissance sur bouillon, gélatine, gélose nutritive et pommes de terre. Parallèlement à la réduction démontrée du pouvoir fermentatif, on trouva une diminution de l'énergie de propagation des bacilles, mais aussi une augmentation de leur

résistance à certains agents extrinsèques tels que le phénol. Par conséquent, une variation fonctionnelle dans un certain sens est compatible avec une variation en sens opposé d'une autre fonction, ce qu'on n'a pas constaté jusqu'ici par voie expérimentale, et dont on a nié la possibilité. Donc, ces cultures produites par voie expérimentale ne correspondent point à celles qu'on a trouvées, dans la nature, dans du lait spontanément coagulé.

En conséquence, pour ce qui concerne les bacilles lactiques, nous avons rencontré des conditions tout à fait identiques à celles qu'on a constatées précédemment pour la fonction chromogène et la virulence, c'est-à-dire une variation due à une influence extrinsèque et qui se maintient constante à travers beaucoup de générations.

Or, comment nous expliquer ce phénomène? On a conçu de deux manières les variations constatées jusqu'ici dans la fonction chromogène et dans la virulence. On a pensé y voir une sorte d'altération intrinsèque de la cellule microbienne, ce qui avait fait perdre le pouvoir chromogène et celui de susciter des maladies, altération due à l'influence extrinsèque et se maintenant constante, parce qu'elle se transmet de génération en génération. Ce sont surtout les expériences sur les variations de la fonction chromogène qu'on a employées comme une de nos rares preuves de la perte d'une fonction, perte héréditaire et provoquée par voie expérimentale. D'autres, au contraire, ont maintenu qu'ici nous ne sommes pas en présence d'une véritable formation de races, mais seulement d'un affaiblissement ordinaire de la cellule microbienne, lequel se dissipera dans des conditions vitales extérieurement favorables.

Les expériences faites ici sur la fermentation viennent à l'appui de cette dernière conception d'un affaiblissement ordinaire comme étant la cause du phénomène, en ce sens que, parallèlement au pouvoir fermentatif plus restreint, nous avons

trouvé une moindre énergie de croissance et une allure plus lente de la fermentation. Cependant, comment nous expliquer le maintien invariable de cet affaiblissement à travers la série, souvent fort longue, de repiquages faits ici, tant à la température la plus favorable à la fermentation, que sur un milieu nutritif qui, d'un côté, contient l'aliment correspondant à la fermentation, et, de l'autre, est regardé ordinairement comme un excellent liquide nutritif? Ne sommes-nous donc pas vraiment en présence ici de races nouvelles ayant subi une perte permanente ou temporaire du pouvoir de former des acides dans des proportions aussi grandes qu'à l'ordinaire, ou bien ce phénomène n'est-il pas dû au fait que, la cellule microbienne ayant subi un affaiblissement général, ce pouvoir ne saurait arriver à se développer dans les conditions où nous cultivons les bacilles, c'est-à-dire dans le lait, qui, on devrait alors se l'imaginer, renfermerait quelque agent destructeur?

En ce qui concerne la fonction chromogène et la virulence, nous savons bien peu de chose sur le rôle que jouent nos milieux de culture dans la fonction en question, et même ici, pour la part de la fermentation, nous ne pouvons nullement exclure d'avance la présence de quelque agent nuisible dans le lait, malgré que ce liquide semble devoir être tenu pour un milieu nutritif particulièrement bon.

Pour apprendre si, en somme, la présence, dans le liquide nutritif, d'un agent enrayant la fermentation pourra entretenir un affaiblissement, une fois reçu, du pouvoir fermentatif, de telle sorte qu'à travers des générations il se maintienne à un niveau constant, on a fait dans du lait additionné d'une même dose de phénol, des cultures parallèles et du type primitif et d'un type relativement affaibli, surgi dans une vieille culture. Voici ce qu'on peut citer à titre d'exemple du résultat de ces expériences.

Acidité, 2^e jour, d'un lait phéniqué (15^{cc} + 0,5 d'une solution de phénol à 3 p. c.) à 35°.

	Type non affaibli	Type relativement affaibli
Moyenne des 10 premières cultures	80	71
des 10 cultures successives	77	58
» » » 	68	56
» » » 	66	47
» » » 	67	48
» » » 	66	48

Après la 60^e culture dans le phénol, on recueillit la matière des deux séries et l'on en inocula dans du lait ordinaire; puis, après peu de repiquages, la fermentation monta jusqu'à 90.

Ici nous avons donc un type relativement affaibli — c'est-à-dire un type qui, cultivé dans du lait ordinaire, fait fermenter le lait, après un ou deux repiquages, tout à fait comme la culture primitive et qui, par conséquent, ne subit assurément pas de perte permanente du pouvoir fermentatif — type qui, semé dans le même lait légèrement phéniqué, comme la culture primitive, accuse une fermentation qui, continuée à travers beaucoup de générations, est plus basse, et parfaitement constante pendant les 30 derniers repiquages. En conséquence, ces deux cultures parallèles offrent parfaitement le tableau d'une formation brute à l'instar de ce qu'on vient de voir et, pour cette raison, la présence, dans le milieu nutritif, d'un agent enrayant la fermentation pourra très bien être la cause de ce qu'un affaiblissement une fois reçu dans la courbe de fermentation de la cellule microbienne se maintient invariable à travers des générations, sans que cet affaiblissement tienne à une perte permanente du pouvoir fermentatif.

Or, est-ce que le lait ordinaire renferme un pareil agent enrayant la fermentation? Les deux observations qui suivent, vont nous éclairer sur ce point.

Une des cultures à fermentation faible, et surgie après culture dans du lait phéniqué, avait accusé une acidité d'environ 64, à travers 30 cultures à peu près, dans du lait ordinaire exempt de phénol. A partir de la 30^e culture, on entreprit deux séries de repiquages parallèles, l'une dans du lait récemment acheté et stérilisé, l'autre dans du lait étant resté pendant deux mois à l'état stérile et qu'on autoclava encore avant l'expérience. Dans la première série de lait, la fermentation se maintint à environ 64, mais dans la seconde, elle sauta, dès le premier échantillon, jusqu'à 90, et maintint cette cote pendant dix repiquages dans le même lait. On fit servir les 2^e et 3^e repiquages à ensemercer du lait ordinaire, le même lait qu'on avait employé dans la série de lait mentionnée en premier lieu, ensemençant qu'on poursuivit dans dix repiquages, qui accusèrent tous une basse fermentation d'environ 64. On fit encore servir le 10^e repiquage à ensemercer du lait ordinaire, et voilà que ces échantillons de lait accusèrent la même haute fermentation primitive de 90. Quelle a été la cause de ce retour subit de la fermentation à son intensité primitive, dans ce lait vieux de deux mois? Je ne puis rien préciser là-dessus; mais que ce phénomène tienne à la nature variable du lait même, et qu'il ne soit dû à une erreur expérimentale, par exemple, à une contamination, c'est ce que prouve l'ensemencement, fourni par la 2^e et la 3^e génération, dans du lait ordinaire, où l'acidité revient à sa cote moindre caractérisant le type affaibli. Pour avoir été trouvée par hasard et n'avoir pu être refaite plus tard, cette observation nous montre qu'en tout cas et principalement, ce doit être des agents enrayants apportés par le lait qui entretiennent l'affaiblissement une fois reçu, et que dès la disparition de ces derniers, le type affaibli récupère sa force primitive.

Voici la seconde observation, qui constate également l'importance du milieu nutritif pour la fermentation: tous les types

à fermentation faible accusèrent dans du lait d'été, c'est-à-dire du lait datant des mois de juin-septembre, une fermentation relativement plus forte que dans du lait provenant des autres mois de l'année. On peut noter à titre d'exemple que le type qui, pendant les mois d'hiver, avait accusé, à travers beaucoup de générations, une fermentation constante d'environ 64, accusa, durant les mois d'été successifs et à la même température (35°) un degré de fermentation d'environ 78, pour redescendre, pendant les mois d'automne, à peu près jusqu'à 68. On constate donc, dans le milieu nutritif naturel, le lait, une différence relative aux saisons à l'égard de ces rapports vis-à-vis du pouvoir fermentatif des bacilles lactiques.

Il résulte donc des phénomènes qu'on vient d'exposer: que, tout en se maintenant constante à travers une très longue série de repiquages, c'est-à-dire autant de repiquages qu'on a effectués en définitive, la variation du pouvoir fermentatif des bacilles lactiques, variation constatée par ces expériences et provoquée par voie expérimentale, ne peut pas être regardée comme une formation brute proprement dite en ce sens que les bacilles ont perdu le pouvoir de former de l'acide lactique dans les mêmes proportions que la culture primitive, mais qu'ici il ne s'agit que d'une formation apparente de races, suscitée par des agents pernicioeux extrinsèques, renfermés dans le milieu nutritif.
