

ANNALES SCIENTIFIQUES DE L'É.N.S.

L. BOUTROUX

Sur une fermentation nouvelle du glucose

Annales scientifiques de l'É.N.S. 2^e série, tome 10 (1881), p. 67-130

http://www.numdam.org/item?id=ASENS_1881_2_10__67_0

© Gauthier-Villars (Éditions scientifiques et médicales Elsevier), 1881, 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/>

SUR UNE

FERMENTATION NOUVELLE

DU GLUCOSE,

PAR M. L. BOUTROUX,
AGRÉGÉ-PRÉPARATEUR A L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE.

INTRODUCTION.

Les travaux de M. Pasteur sur la culture des organismes microscopiques ont ouvert une méthode nouvelle pour l'étude des phénomènes chimiques dus à la vie de ces organismes. Cette méthode consiste à isoler à l'état de pureté l'être qui joue le rôle de ferment et à le cultiver dans des milieux de composition connue. Agissant isolément, il a un rôle bien défini, et la comparaison du milieu nutritif avant et après son intervention fournit des résultats invariables.

Telle est la méthode qui a été suivie dans ce travail. Le hasard m'a fait rencontrer dans le moût de bière des brasseurs, ou dans la bière ordinaire, un micro-organisme qui rend le moût acide. J'ai séparé cet organisme de ceux auxquels il se trouvait associé, puis j'ai étudié les conditions de son existence et l'action chimique qu'il exerce sur le sucre.

Dans l'application, il se présente dès le début un problème qui eût été, il y a quelques années, d'une solution difficile. Pour pouvoir étudier un micro-organisme, il faut le semer dans un liquide qui ne soit à aucun moment habité par un autre organisme. Il faut donc opérer sur

des liquides parfaitement stériles. L'ébullition des liquides, autrefois l'unique moyen de stérilisation, n'est pas toujours suffisante. En 1862, M. Pasteur ⁽¹⁾ reconnut qu'en faisant bouillir pendant plusieurs minutes, à la pression ordinaire, soit du lait seul, soit certains liquides acides en présence du carbonate de chaux, on ne rendait pas ces liquides stériles, et il attribua ce fait à ce que ces liquides étaient ou devenaient bientôt neutres ou légèrement alcalins, tandis que ceux que stérilise sûrement l'ébullition à 100°, tels que le moût de raisin ou le moût de bière, sont acides. Depuis, d'autres observateurs, MM. Tyndall et Roberts, en Angleterre, F. Cohn en Allemagne, trouvèrent des exemples de liquides non stérilisés par une ébullition de quelques minutes. En 1879, M. Ch. Chamberland ⁽²⁾ montra d'une manière générale que les liquides neutres, quels qu'ils soient, ne sont pas sûrement stérilisés par quelques minutes d'ébullition à 100°; que les liquides faiblement acides, après avoir été chauffés à 100°, peuvent rester sans altération et pourtant n'être pas réellement stériles, car il peut suffire d'en neutraliser l'acide sans y introduire de nouveaux germes pour voir se produire un développement de micro-organismes; enfin qu'une acidité supérieure à 5^{cc} d'acide normal décime pour 20^{cc} de liquide suffit pour assurer la stérilisation absolue par quelques minutes d'ébullition à 100°. Quant aux liquides neutres, il vérifia qu'ils sont toujours stérilisés par une exposition de quelques minutes à une température de 110° ou 115°, comme M. Pasteur l'avait constaté pour le lait et pour plusieurs liquides acides traités par la craie.

De plus, MM. Pasteur et Joubert ⁽³⁾ ont montré que toutes les eaux qui sont ordinairement à notre disposition pour laver les vases sont chargées de germes de bactéries et que ces germes ⁽⁴⁾ peuvent supporter à l'état sec une température de 120° à 130° pendant plusieurs minutes, d'où il résulte que, lorsqu'on chauffe un liquide en vase clos à une température de 110° ou 115°, les parties du vase qui ne sont pas mouillées par le liquide chaud peuvent conserver des germes susceptibles de déve-

(1) *Annales de Chimie et de Physique*, 3^e série, t. LXIV.

(2) *Recherches sur l'origine et le développement des organismes microscopiques* (Thèse présentée à la Faculté des Sciences de Paris; 1879).

(3) *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. LXXXIV, p. 206; 1877.

(4) *Ibid.*, t. LXXXV, p. 179.

loppement, à moins que le vase n'ait été préalablement chauffé à une température très élevée qui ait détruit toute matière vivante à sa surface. Nous désignerons souvent cet échauffement préalable des vases par le mot de *flambage*.

La connaissance de ces faits permet d'obtenir facilement des milieux de culture neutres parfaitement purs, et par suite d'étudier autant de générations qu'on veut d'un micro-organisme sans aucun mélange, une fois qu'on a réussi à se procurer de la semence pure.

PREMIÈRE PARTIE.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU FERMENT.

I. — Purification de la semence.

La semence primitive qui a été l'origine de toutes mes cultures est le fond d'une bouteille de bière ordinaire. J'en introduisis une goutte dans de l'eau de malt sucrée. Il se développa de la levûre et d'autres micro-organismes, l'un d'eux plus rapidement que les autres; en même temps la liqueur devenait acide. J'ensemenciai un second vase avec une goutte du premier, un troisième avec une goutte du second, et ainsi de suite, en ne laissant s'écouler qu'un ou deux jours entre deux ensemencements consécutifs et en prenant toutes les précautions d'usage pour éviter l'introduction de germes étrangers. Pendant ces cultures successives, faites dans des milieux variés, je vis disparaître la levûre et les autres impuretés, et, au bout d'un certain nombre de générations, j'avais isolé l'organisme qui transformait le sucre en acide.

J'ai obtenu dans une autre circonstance, et fortuitement, une séparation plus rapide de cet organisme. J'avais reçu du moût de bière d'une brasserie d'Alsace. Ce moût s'était altéré pendant le voyage. Examiné au microscope, il présentait de la levûre de bière et divers

organismes plus petits. Ayant alors en vue une solution du problème de la purification de la levûre commerciale, je semai, sans précautions particulières, une goutte de ce liquide dans une fiole contenant un mélange d'eau de malt, d'eau de levûre et de sucre, où je faisais passer un courant d'acide carbonique; le vase était placé dans une étuve à 35°. J'espérais, au moyen de l'acide carbonique, paralyser surtout les organismes autres que la levûre. Le résultat fut un peu différent : tous les organismes présents furent plus ou moins paralysés; deux surtout résistèrent, la levûre et l'organisme particulier que j'étudiais. Une goutte du contenu de cette fiole fut semée, avec les précautions nécessaires pour éviter les impuretés nouvelles, dans une semblable, traversée également par un courant d'acide carbonique. Deux jours après, une goutte du liquide de cette fiole fut semée dans un petit tube contenant un mélange sucré et en communication avec l'air par un tube capillaire. La semence était très pauvre; on n'y pouvait guère distinguer au microscope que de rares cellules de levûre de bière : le surlendemain ce tube présentait à la surface un voile de l'organisme dont je m'occupe et au fond un dépôt de levûre. Semant avec une petite pointe de verre un lambeau du voile dans un liquide sucré, j'eus immédiatement cet organisme à l'état pur, ou plutôt mélangé uniquement d'un peu de levûre de bière, impureté facile à éliminer par cultures successives.

L'organisme une fois isolé, il était facile de l'étudier au point de vue morphologique et physiologique.

II. — Description du micro-organisme.

Semons une goutte de liquide chargé de semence jeune dans un vase ouvert, tel que ceux qui seront décrits plus loin, contenant de l'eau de levûre additionnée de glucose, et plaçons le vase dans une étuve à 33°. Au bout de trois ou quatre heures, une prise microscopique faite à la surface du liquide montre des cellules ovales ou sphériques, très gonflées, ayant à leur intérieur un noyau assez net (*fig. 1*). Elles sont souvent de grosseur très inégale; chez les plus grosses, le petit diamètre est à peu près de 3 micromillimètres ⁽¹⁾. Quelques cellules sont

(1) Je désigne, suivant un usage adopté, par le terme de *micromillimètre* le millième de millimètre.

isolées, à peu près sphériques; d'autres présentent en leur milieu un étranglement, auquel participe le noyau, et qui leur donne en coupe la forme d'une lemniscate; d'autres sont groupées deux à deux, ou en chapelets plus ou moins sinueux, composés d'un nombre indéfini de grains; quelquefois deux chapelets partent d'une même cellule, très grosse, sphérique; enfin on voit de larges amas de cellules, serrées les unes contre les autres, et conservant cependant une vague disposition gémignée ou moniliforme. Aucune de ces cellules n'a de mouvement propre (1).

Fig. 1.



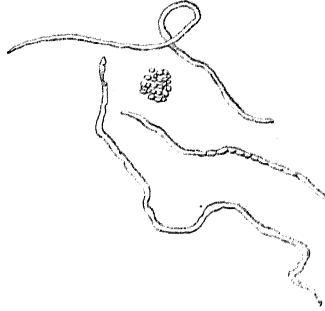
Quelques heures plus tard, on commence à distinguer à la surface libre du liquide un voile léger. Le lendemain, le voile est devenu blanc; il est velouté sur sa face inférieure; le surlendemain, il laisse pendre dans le liquide une multitude de petits filaments qui ressemblent à des racines. Ce voile n'a aucune ténacité; il se laisse percer sans se rider; la moindre agitation le disloque en lambeaux écailleux qui tombent au fond du vase. A mesure que les cellules se multiplient, elles diminuent de grosseur; leur diamètre devient égal environ à 1 micromillimètre ou moins encore; on n'y distingue plus de noyaux; elles ont une réfringence plus différente de celle du liquide environnant. La disposition en chapelets devient plus rare, et les amas sont de plus en plus serrés et confus. Si le milieu ne contient que de l'eau de levûre et du glucose, les cellules conservent toujours leur forme de petits grains; mais si au liquide on a ajouté de la craie, on observe, quand l'action chimique est terminée, et que les cellules, vicillies, cessent de se reproduire, un lent changement de forme qui pourrait faire croire à la présence d'une espèce étrangère. Citons quelques expériences.

Un ballon contenant de l'eau de levûre, du glucose et de la craie en excès a été ensemencé le 30 août 1877 avec l'organisme en grains, paraissant pur au microscope. Au bout de quatre mois environ, le dépôt

(1) Dans la *fig. 1* et dans les figures microscopiques qui suivent, le grossissement est d'environ 400 diamètres.

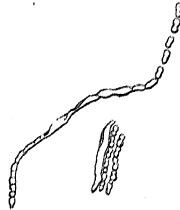
est examiné : on n'y trouve que des grains groupés irrégulièrement. Deux mois plus tard, nouvel examen microscopique : cette fois on rencontre, outre les grains, des filaments grêles, courbes, de forme tout à fait irrégulière, d'une longueur indéterminée, variant depuis quelques micromillimètres jusqu'au diamètre du champ du microscope (*fig. 2*). Dans ces filaments on distingue parfois des cloisons irrégulièrement espacées, formant quelques grains à peine discernables. La réaction au tournesol est alors parfaitement neutre.

Fig. 2.



Ces filaments appartiennent-ils à la même espèce que les grains, ou à une espèce étrangère ? Pour le savoir, je les sème dans de l'eau de levûre sucrée pure. Deux jours après, j'examine les organismes qui se sont produits : je trouve les cellules rondes ou ovales ordinaires, et, de plus, de longs filaments courbes, composés d'articles inégaux en grosseur et en longueur. Certaines parties d'un même filament présentent des cloisons à peu près indistinctes, tandis que d'autres parties sont en chapelets à grains doubles écartés les uns des autres (*fig. 3*). Donc les cel-

Fig. 3.



lules étranglées qui constituent la forme jeune du micro-organisme ont été engendrées par les filaments de la semence vieillie.

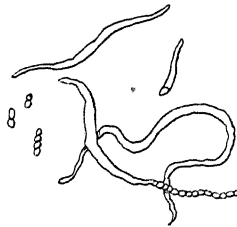
Cette même semence filamenteuse, cultivée plus tard dans de l'eau de levûre sucrée sans craie, a donné lieu à une grande acidité, et les organismes de cette culture, examinés six mois après l'ensemencement, ont présenté exclusivement la forme de grains.

Mais pourquoi cette différence de forme suivant la présence ou l'absence de la craie? Si je sème, dans des liquides semblables, d'une part des cellules en grains, empruntées à une culture faite sans craie et commencée cinq ou six mois auparavant, d'autre part des cellules filamenteuses, empruntées à une culture faite en présence de la craie et commencée en même temps que la précédente ou même plus tôt, j'observe que la seconde semence seule est capable de se développer. La différence de forme dont il s'agit tient donc à ce que le milieu contenant de la craie est mieux approprié à l'existence du micro-organisme et lui permet de vivre plus longtemps. La forme filamenteuse caractérise les cellules vieilles, la forme granuleuse caractérise les cellules mortes jeunes.

A aucun moment je n'ai vu se former de spores à l'intérieur des cellules. L'observation du développement de la semence ne paraît pas non plus indiquer qu'il en existe. Quand de la semence vieille commence à se développer, on voit les cellules de toutes formes, les longs tubes comme les grains à peu près sphériques, se renfler beaucoup et pousser à leurs extrémités des cellules ovales étranglées (*fig. 3*). Ce sont donc les vieilles cellules elles-mêmes qui se rajeunissent.

Outre les formes précédentes, qui sont normales, on rencontre accidentellement des formes monstrueuses, dues à un défaut dans le milieu

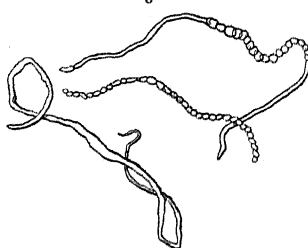
Fig. 4.



nutritif. Ainsi, j'ensemenciai une fois une dissolution de miel pur avec de la semence normale. Le lendemain il y avait eu développement, mais l'organisme avait pris la forme de longs tubes sinueux, renflés au milieu, présentant quelquefois à une extrémité un chapelet effilé (*fig. 4*).

J'ai obtenu à peu près les mêmes formes en semant l'organisme normal dans un liquide épuisé par une fermentation terminée et auquel j'avais ajouté un peu de glucose. Il y eut développement, production d'acide, mais l'organisme, mal nourri, prit des formes très irrégulières; c'étaient de longues cellules en fuseau ou des cellules globuleuses inégales, disposées en chapelets, d'où partaient de longs tubes sinueux renflés à certaines parties (*fig. 5*).

Fig. 5.



Dans ces deux cas l'organisme manquait d'aliment azoté, et ce défaut s'est traduit par la forme filamenteuse. Mais cette forme différerait de celle des cellules vieilles normales en ce que ces dernières sont grêles, tandis que les cellules jeunes irrégulières sont souvent plus grosses que les cellules jeunes normales.

Tels sont les caractères morphologiques de l'être qui nous occupe. Étudions-en maintenant les caractères physiologiques.

III. — Milieu nutritif où vit le micro-organisme.

Le milieu dans lequel il vit se compose d'un liquide et de l'atmosphère en contact avec ce liquide. Cherchons d'abord les conditions que doit remplir cette atmosphère.

1° *Milieu gazeux*. — Notre micro-organisme a-t-il besoin ou non d'oxygène libre pour vivre? Est-il *aérobie* ou *anaérobie*? L'expérience va répondre.

J'ensemence des ballons d'eau de levûre sucrée, puis je les ferme à la lampe. Au bout de quelques jours, je fais l'analyse des gaz contenus dans les ballons. Quelquefois, dès le troisième jour, tout l'oxygène a disparu; il est remplacé par un volume beaucoup moindre d'acide carbonique. Voici l'une de ces analyses.

Ballon contenant 50^{cc} de liquide sucré et 51^{cc} d'air. Analyse faite deux jours après l'ensemencement.

Volume de gaz prélevé.....	15,6 ^{cc}
Après la potasse.....	15,2
Après l'acide pyrogallique.....	15,2

Le gaz restant est de l'azote. Ainsi, tout l'oxygène a disparu; les 15^{cc}, 2 d'azote qui restent représentent un volume d'air primitif contenant 4^{cc} d'oxygène. Ces 4^{cc} d'oxygène ont été remplacés par 0^{cc}, 4 d'acide carbonique libre et par une certaine quantité d'acide carbonique dissous, c'est-à-dire que l'oxygène présent a été remplacé par la dixième partie environ de son volume d'acide carbonique libre. D'autres analyses ont donné les mêmes résultats : absorption complète de l'oxygène et dégagement d'acide carbonique en quantité variable, mais toujours inférieure au tiers du volume d'oxygène primitif.

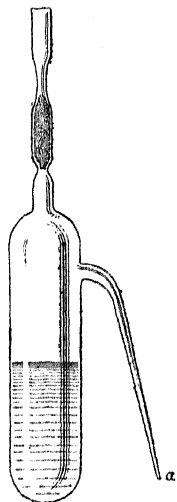
Dans des tubes où le gaz en contact avec le liquide était de l'oxygène pur, le développement a été considérable et l'oxygène a entièrement disparu.

Ainsi notre organisme, ayant de l'oxygène à sa disposition, l'emploie intégralement. Peut-il cependant s'en passer pour vivre? J'ai pris trois tubes analogues à ceux qu'on emploie au laboratoire de M. Pasteur, mais à une seule branche au lieu de deux (*fig. 6*). Au moyen de la tubulure effilée *a*, j'introduis de la semence jeune, puis du liquide nutritif stérilisé par la chaleur (mélange d'eau de levûre et de glucose); je fais le vide dans les tubes au moyen de la pompe à mercure, et je les porte à l'étuve. Au bout de cinq jours, il n'y a aucune trace de développement visible à l'œil. J'ouvre deux des tubes, en n'y laissant rentrer que de l'air filtré par le coton : l'examen microscopique montre qu'en effet la semence ne s'est pas développée. Au bout de quelques jours, les deux tubes où j'ai laissé rentrer l'air présentent un voile. Le troisième tube, conservé, ne donne dans la suite aucune marque de développement.

Ainsi l'organisme ne peut pas se développer dans un milieu sucré sans oxygène; mais la privation de ce gaz ne le tue pas, au moins en quelques jours. La vie ne se conserve cependant pas indéfiniment dans

ces conditions, car, le troisième tube de l'expérience ci-dessus ayant été ouvert au bout de deux ans, il ne s'y produisit aucun développement.

Fig. 6.



Nous pouvons donc déjà affirmer que notre organisme est essentiellement aérobic. Poussons plus loin l'étude du rôle des gaz dans l'entretien de sa vie.

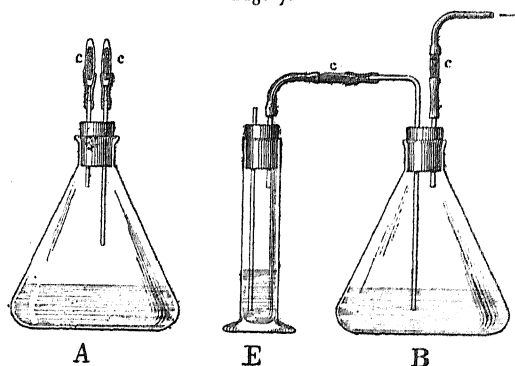
De même que le vide, l'acide carbonique s'oppose au développement, mais ne tue pas la semence; j'en ai déjà donné la preuve en décrivant l'un des procédés par lesquels j'ai isolé cet organisme. J'ai d'ailleurs fait l'expérience avec plus de précision en employant de la semence pure; elle a donné le même résultat. Un courant d'acide carbonique, passant pendant cinq jours, s'est opposé à tout développement; une vie active s'est manifestée dès que l'acide carbonique a été remplacé par de l'air.

Nous savons qu'il faut fournir de l'oxygène à notre organisme pendant tout le temps de sa vie; mais il faut que cet oxygène soit exempt de germes pour que la pureté se conserve. Un moyen simple se présente: puisque l'acide carbonique dégagé a un volume bien moindre que l'oxygène employé, si l'on fait la fermentation dans un vase ouvert, il y aura aspiration continuelle, et par conséquent appel de l'air extérieur; si l'on bouche le vase par un tampon de coton chauffé préalable-

ment, cet air entrera filtré. Ce procédé réussit lorsque le liquide n'est pas apte à fournir un développement considérable; mais, dans le cas contraire, et surtout lorsqu'on a mis de la craie pour saturer constamment l'acide qui se forme, ce qui donne une source nouvelle d'acide carbonique, on observe un arrêt prématuré dans le développement, et l'analyse du gaz montre alors la disparition à peu près complète de l'oxygène; il faut donc renouveler l'air artificiellement.

J'ai étudié les conditions à remplir pour renouveler l'air de la manière la plus avantageuse possible. Deux fioles contiennent le même liquide: de l'eau de levûre sucrée sans craie, stérilisée. Dans l'une, A (*fig. 7*), le gaz est en communication avec l'atmosphère par deux tubes

Fig. 7.



bourrés de coton, *c, c*. L'autre, B, est disposée de manière que le liquide puisse être traversé par un courant d'air humide, filtré, appelé par une trompe. La figure indique suffisamment cette disposition. Les deux fioles sont ensemencées avec la même semence, puis on fait passer le courant d'air dans la fiole B. La mesure du développement sera donnée à chaque instant par l'acidité produite. Or, au bout de trois jours, 10^{cc} du liquide A étaient neutralisés par 7^{cc},6 d'eau de chaux, tandis que 10^{cc} du liquide B n'exigeaient que 6^{cc} d'eau de chaux. Par conséquent, le développement était plus rapide dans la fiole sans courant d'air. Il faut conclure de là que, si l'air est utile à l'organisme, l'agitation lui est nuisible.

J'ai alors essayé de renouveler l'air au-dessus du liquide sans faire plonger le tube d'arrivée, mais en le faisant descendre tout près du ni-

veau du liquide. Une expérience faite comme la précédente, sauf cette modification, a encore donné l'avantage à la fiole sans courant d'air. Ce procédé m'a au contraire donné d'excellents résultats dans le cas où la fermentation avait lieu en présence de la craie. Sous l'influence du courant d'air sans barbotage, la transformation du sucre était poussée beaucoup plus loin.

Notre organisme est donc aérobie. Il ne peut vivre ni dans le vide ni dans l'acide carbonique. Il absorbe tout l'oxygène qu'on met à sa disposition et rend un volume d'acide carbonique bien inférieur. L'oxygène doit lui être fourni sans agitation du liquide. Voyons maintenant les conditions que doit remplir le milieu liquide dans lequel on le cultive.

2° *Milieu liquide.* — D'abord, le sucre n'est nullement indispensable à la vie de notre organisme. Il se développe à merveille dans une décoction de levûre de bière ne contenant pas trace de sucre, et le développement n'y paraît pas moindre que dans ce même liquide additionné de glucose; seulement, avec le glucose il se produit un acide, sans glucose la liqueur reste neutre ou devient très légèrement alcaline.

L'acidité produite dans les milieux sucrés va nous servir de mesure pour la comparaison des différents liquides nutritifs qu'on peut employer.

J'ai comparé les aliments azotés suivants :

Décoction de levûre ;
 Infusion de foin faite à froid ;
 Décoction de malt des brasseurs ;
 Urine ;
 Petit-lait ;
 Décoction de carottes, de navets, d'oignons ;
 Solution de sels.

Je n'ai pas obtenu de cultures dans des milieux minéraux. J'ai essayé le mélange suivant :

Sucre candi ou glucose.....	100 ^{gr}
Phosphate d'ammoniaque.....	4
Phosphate de potasse.....	4
Sulfate de magnésie.....	1
Sulfate d'ammoniaque.....	1

le tout étendu avec de l'eau distillée à 1500^{cc} : c'est, avec très peu de modifications, le liquide employé par M. Pasteur pour la fermentation du lactate de chaux. Ce liquide, abandonné à l'air impur dans un verre, s'est troublé en quelques heures, une multitude d'organismes attestant ses qualités nutritives. Mais ma semence pure, introduite dans le même liquide stérilisé, ne s'est pas développée assez pour former un voile à la surface. Voici un autre mélange, très propre à la culture de beaucoup d'organismes, qui ne m'a pas donné plus de succès :

Sucre candi interverti par l'acide tartrique ..	145 ^{gr}
Phosphate de potasse.	4
Sulfate de magnésie.	4
Phosphate tribasique de chaux.	} quantité indéterminée
Tartrate d'ammoniaque.	

le tout étendu d'eau, de manière à former 1^{lit} de dissolution. C'est, à l'addition du sucre près, un liquide employé par Cohn pour la culture des bactéries.

Le petit-lait et l'urine m'ont également donné de mauvais résultats.

Les autres liquides, décoctions de légumes, eau de levûre, eau de malt, eau de foin, m'ont au contraire donné de bonnes cultures. La comparaison des acidités produites avec le glucose a été à l'avantage de l'eau de levûre : ainsi, dans deux fermentations où je comparais l'eau de levûre et l'eau de malt, l'acidité a été, au bout de sept jours, de 32 d'eau de chaux pour 20 de liqueur avec l'eau de levûre, et seulement de 23,8 d'eau de chaux avec l'eau de malt. L'eau de foin et l'eau de carottes paraissent également fort bien appropriées à cette culture.

Comparons maintenant entre elles diverses espèces de sucre. Le sucre candi, le sucre interverti et le glucose sont aptes à être acidifiés par notre organisme ; l'expérience suivante montre dans quel ordre. Des ballons contiennent de l'eau de levûre sucrée avec les trois espèces de sucre dans les mêmes proportions ; il y a deux ballons de chaque sorte ; je lesensemence tous ensemble. Au bout de quatre jours, je mesure l'acidité d'un ballon de chaque sorte, et je répète les mêmes mesures au bout de vingt-six jours avec les trois ballons qui restent ; chaque fois que j'ouvre un ballon, je m'assure au microscope que l'organisme est resté parfaitement pur.

Voici les résultats :

Nature du sucre.	Acidité pour 20 de liquide	
	au bout de quatre jours.	au bout de vingt-six jours.
Glucose.....	32 d'eau de chaux	73,6
Sucre interverti....	28 ⁽¹⁾ »	34,0
Sucre cristallisé....	14 »	15,2

Ainsi le glucose s'est montré préférable au sucre interverti, et celui-ci au sucre cristallisé. Le résultat a été le même quand j'ai remplacé l'eau de levûre par de l'eau de malt; seulement, comme ce liquide est inférieur à l'eau de levûre, toutes les acidités sont plus petites que les précédentes. Les mesures ont été faites seulement au bout de quatre jours.

Nature du sucre.	Acidité pour 20.
Glucose.....	23,8
Sucre interverti.....	5,3
Sucre cristallisé..	1,0

C'est donc avec le glucose que, toutes choses égales d'ailleurs, la transformation chimique est poussée le plus loin.

J'ai encore essayé si le sucre de lait pourrait convenir. De l'eau de levûre additionnée de ce sucre a fourni un développement assez abondant, mais une acidité très faible. La présence de l'eau de levûre suffit pour expliquer ce développement; quant au sucre de lait, il avait résisté presque entièrement. J'ai fait une culture dans le même liquide additionné de craie, ce qui favorise le développement. Je n'ai pas vu une seule bulle d'acide carbonique sortir de la craie, et le liquide, mis à cristalliser au bout de quatre mois, n'a abandonné que des cristaux de lactose. Ce sucre n'est donc pas modifié par notre micro-organisme.

Les comparaisons précédentes nous amènent à préférer aux autres mélanges celui d'eau de levûre et glucose. Quant aux proportions dans lesquelles entrent ces deux corps, elles peuvent varier entre des limites très éloignées sans qu'il en résulte aucun changement appréciable dans la rapidité du développement. Le mélange que j'ai employé

(¹) Les liquides contenant du sucre interverti étaient acides d'avance; leur acidité primitive, qui était de 6, a été retranchée de l'acidité trouvée.

le plus ordinairement se compose de $\frac{1}{4}$ d'eau de levûre (faite avec 10 d'eau de levûre et 100 d'eau) et de $\frac{3}{4}$ de dissolution de glucose du commerce à 22 pour 100, marquant environ 12° B. On pourrait certainement mettre moins d'eau de levûre, comme le montre l'expérience suivante. Un mélange de 100^{cc} de glucose à 10° B., 29^{cc} d'eau de levûre et craie en excès fut ensemencé; quatre mois après, la fermentation étant parfaitement terminée, le liquide fut décanté, additionné de son volume de glucose à 12° B., stérilisé et ensemencé. Un nouveau développement se produisit, et une acidité de 76 d'eau de chaux pour 20 fut atteinte. Le liquide fut saturé avec de la craie et filtré. 30^{cc} de ce nouveau liquide furent additionnés de 70^{cc} de glucose à 12° B. Le mélange fut stérilisé et ensemencé. Le développement eut encore lieu, mais cette fois l'organisme prit la forme filamenteuse anormale; ce sont les filaments de cette culture qui ont été représentés dans la *fig. 5*. Néanmoins il se produisit encore une acidité de 30 d'eau de chaux pour 20 dans ce liquide, qui ne contenait guère que 4 pour 100 d'eau de levûre. On peut donc fixer à peu près à 5 pour 100 le minimum d'eau de levûre qu'il faut associer à une dissolution de glucose à 20 pour 100. Seulement il faut remarquer que le glucose employé était impur et pouvait apporter par lui-même quelques éléments nutritifs non sucrés.

Lorsqu'on cultive notre micro-organisme dans le mélange d'eau de levûre et de glucose qui a été reconnu pour le meilleur, le milieu devient de plus en plus acide, et la fermentation s'arrête bientôt, sans que le sucre ait été entièrement employé. Il y a lieu de rechercher si cet arrêt est dû à l'acidité même ou à un défaut de substance nutritive. Pour le savoir, j'ai mesuré dans un grand nombre de cas l'acidité finale, le liquide de culture ayant toujours à peu près la même composition. Loin de trouver une limite fixe pour l'acidité, j'ai obtenu des résultats très variables. Quelquefois tout développement s'arrêtait quand l'acidité n'était que de 12, 14 ou 16 d'eau de chaux pour 20; d'autres fois, l'acidité finale était de 25 à 35⁽¹⁾; d'autres fois elle s'élevait à 55; enfin elle a atteint 73. Dans ces diverses cultures, le milieu était bien toujours composé d'eau de levûre et de glucose à peu près dans les

(1) Les nombres que j'emploie comme mesures d'acidité désignent toujours le volume d'eau de chaux nécessaire pour saturer 20^{cc} de liquide acide.

mêmes proportions, mais l'eau de levûre n'était pas toujours faite avec la même levûre, et le glucose, toujours plus ou moins brun, pouvait aussi présenter des différences de composition sensibles pour le micro-organisme; c'est dans la variation de ces substances qu'il faut chercher la cause de la variation de l'acidité finale, car, dans des cultures faites avec la même eau de levûre et le même glucose, j'ai obtenu des acidités finales peu différentes les unes des autres.

Ces expériences ne m'ont donc pas donné une acidité limite au delà de laquelle la vie du ferment devienne impossible; mais il pourrait bien en exister une, égale ou supérieure à 73. Quand au même mélange sucré on ajoute de la craie en excès, l'acide est neutralisé à mesure qu'il se forme, et la quantité finale de sel de chaux produit correspond à une acidité beaucoup plus grande que celle qu'atteignent les cultures sans craie. J'ai obtenu ainsi des acidités de 112, 128, 140, 173, 240, 263.

Cependant il n'en faut pas conclure encore que dans les cultures sans craie c'est l'acide libre qui empêche l'acidité de s'élever à de pareilles valeurs. L'expérience suivante va nous montrer quel est le véritable rôle de la craie. Un flacon renfermant de l'eau de levûre, du glucose et une quantité de craie insuffisante pour saturer tout l'acide possible fut ensemencé au mois de novembre 1878. Toute la craie disparut; puis, la fermentation continuant, le liquide devint de plus en plus acide. Quand la fermentation fut terminée, l'acidité était de 112 pour l'acide libre seulement; il y avait en outre la quantité non mesurée de sel de chaux correspondant à la craie dissoute. Ainsi, dans cette culture, après la disparition de la craie, il s'était produit une quantité d'acide aussi grande que celle qui se forme souvent en présence d'un excès de craie. Ajoutons que ce flacon fut conservé jusqu'au mois de juin 1880; à ce moment le dépôt, examiné au microscope, présentait du ferment en grande partie sous la forme filamenteuse. Ce ferment, âgé d'un an et demi, fut semé dans de l'eau de levûre sucrée. Je semai en même temps, dans un liquide semblable, le dépôt d'une culture faite sans craie, beaucoup plus récente, remontant seulement à cinq mois, où l'acidité était beaucoup moindre et où les organismes présentaient exclusivement la forme en grains. Cette dernière semence ne se développa point; l'autre produisit un beau voile en deux jours. Ainsi la semence de cinq mois, conservée dans un liquide sans craie, peu acide, était morte,

tandis que la semence d'un an et demi, qui avait crû dans un liquide calcaire, mais qui avait été conservée dans un milieu très acide, était restée vivante. Par conséquent le ferment supporte une acidité sans limite, et la craie est utile, non pour empêcher l'acidité de croître indéfiniment, mais pour servir d'aliment au micro-organisme.

J'ai cherché si d'autres corps pouvaient remplacer la craie. Le carbonate de magnésie donne des résultats presque aussi satisfaisants que celui de chaux. La décomposition du sucre a été poussée assez loin en présence des carbonates de zinc, de strontiane et de baryte; quant au carbonate de plomb, il s'est montré un poison pour le micro-organisme. De tous ces carbonates, le plus avantageux au point de vue exclusif de la culture est certainement celui de chaux.

Pour compléter l'étude de l'influence qu'exerce sur le développement du micro-organisme la nature chimique du milieu, j'ai recherché quelle était la cause qui mettait fin à la fermentation lorsque j'avais réuni toutes les conditions reconnues comme les plus avantageuses.

Je pris un liquideensemencé depuis quatre mois, où la fermentation, faite en présence de la craie, était entièrement terminée. Ce liquide réduisait la liqueur de Fehling. Je chargeai trois ballons de la manière suivante :

1.	Liquide fermenté seul.	
2.	{	
	Liquide fermenté..	25 ^{cc}
	Eau de levûre.....	15
	Eau.....	10
3.	{	
	Liquide fermenté.....	25
	Glucose à 12° B.....	25

Ces trois ballons furent stérilisés par la chaleur, puisensemencés et portés à l'étuve.

Le n° 1 donna un développement très faible; les organismes étaient grêles, filamenteux. La réaction au tournesol resta neutre. Je l'ensemencai au bout de quinze jours avec de la levûre de bière : il ne se fit pas de fermentation.

Le n° 2 donna un développement assez abondant; les organismes produits avaient la forme ordinaire; la réaction resta neutre.

Le n° 3 donna un développement un peu pénible, mais très prolongé; la forme des organismes était la forme ordinaire; le liquide atteignit une acidité de 76 d'eau de chaux pour 20.

Cette expérience prouve que dans le liquide primitif la fermentation s'était arrêtée faute de glucose fermentescible; s'il restait une matière capable de réduire la liqueur cupropotassique, cette matière devait être différente du véritable glucose, puisqu'elle ne s'est pas acidifiée en présence de l'eau de levûre dans le n° 2 et qu'elle n'a pas subi la fermentation alcoolique dans le n° 1. Il devait bien y avoir aussi insuffisance de quelque aliment étranger au sucre, ou excès de quelque principe vénéneux, sans quoi le n° 1 aurait été encore propre au développement; mais ce qu'il importait de constater, c'est que le glucose fermentescible avait été entièrement épuisé.

Ce résultat fut confirmé par de nouvelles expériences, faites avec plus de précision. Le liquide d'une fermentation achevée, qui réduisait abondamment la liqueur de Fehling, fut additionné d'eau de levûre, stérilisé etensemencé avec de la levûre de bière pure. La semence se développa, mais il ne se dégagaa pas une bulle de gaz, et, à la distillation, le liquide ne présenta pas trace d'alcool.

Le liquide d'une autre fermentation achevée, contenant 2,6 pour 100 de matière sucrée, d'après le dosage par la liqueur de Fehling, fut additionné de la moitié de son volume d'eau de levûre, puis stérilisé etensemencé avec le micro-organisme; il ne se produisit pas trace d'acide, quoique la semence se fût bien développée, grâce à l'eau de levûre ajoutée.

Il est donc bien certain que la matière sucrée qui reste n'est pas du glucose fermentescible.

Ainsi le mélange de $\frac{1}{4}$ d'eau de levûre et $\frac{3}{4}$ de glucose à 20 pour 100 avec de la craie en excès et de l'oxygène sans cesse renouvelé est propre à subir une fermentation complète.

IV. — Rôle de la température.

L'influence de la température sur le développement des micro-organismes est un des caractères physiologiques les plus importants pour

chaque espèce; la connaissance de la température la plus favorable au développement de celles qui tuent fournit souvent, en effet, les meilleurs moyens de résoudre le problème de la séparation des espèces associées.

Cherchons d'abord quelles sont les températures propres au développement.

Je prends des tubes à essai ordinaires, je les emplis au quart à peu près d'eau de levûre sucrée neutre, puis je les ferme en les étirant à la lampe, de manière à former une olive à leur partie supérieure (*fig. 8*).

Fig. 8.

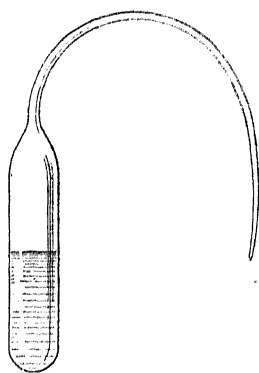


Je les chauffe ensuite à 115° au bain de chlorure de calcium. Quand ils sont refroidis, je coupe l'extrémité de chaque tube et j'ajuste sur l'olive un tube de caoutchouc portant un tube de verre bourré de coton, le tout purifié par la chaleur. J'ensemence les tubes et j'en porte un dans le sous-sol du laboratoire, où la température varie de 9° à 13° pendant le cours de l'expérience, un dans une étuve à 30° , un à 35° , deux à 40° et deux à 46° . Dans le tube à 9° - 13° , je ne vis apparaître de voile qu'au bout de six jours; les tubes à 30° et 35° montrèrent des voiles au bout de deux ou trois jours (le moment de l'apparition n'est pas facile à saisir); dans les tubes à 40° et 46° il n'y eut aucun développement, et même ces tubes, reportés au bout de cinq jours à 30° , sont restés stériles. Le développement est donc possible à 10° ; il est impossible à 40° , et un séjour de cinq jours à cette température tue complètement la semence. La température la plus favorable est voisine de 30° .

Une seconde expérience va nous fournir des résultats plus précis.

Seize tubes à essai ont été bouchés par des tampons de coton et portés à 200° ou 300°. Je les charge d'eau de levûre sucrée stérilisée; je les enseme et je les étire en col de cygne, en laissant l'extrémité ouverte (*fig. 9*). J'en mets quatre à 25°, autant à 29°, 7, à 35°, 5 et à 37°, 5.

Fig. 9.



Au bout de vingt-quatre heures, tous les tubes à 25° ont des voiles très minces; les tubes à 29°, 7 et à 35°, 5 ont des voiles plus épais, et les tubes à 37°, 5 n'ont pas d'apparence de développement visible à l'œil. Huit heures plus tard, tous les tubes ont des voiles, mais ceux des tubes à 37°, 5 sont et demeurent les jours suivants très légers: Quarante-huit heures après l'ensemencement, les acidités sont mesurées dans les trois premiers groupes de tubes.

	Acidité moyenne pour 20.
Tubes à 25°, 0.	14
Tubes à 29°, 7.	22
Tubes à 35°, 5.	19

Il résulte de là que la température la plus favorable au développement est comprise entre 30° et 35°, qu'à partir de 37° le développement est très pénible et qu'il devient impossible à 40°.

Cherchons maintenant la plus basse température à laquelle il suffit d'exposer notre micro-organisme dans un milieu neutre pour le tuer.

Cette température dépend de la durée d'exposition; nous avons déjà vu qu'une exposition de cinq jours à 40° tue le ferment, mais il s'agit maintenant de la température qui tue en quelques minutes. Voici quelques expériences qui la feront connaître. Dix-huit tubes semblables à ceux de l'expérience précédente furentensemencés, étirés en col de cygne et fermés à la lampe. Ces tubes furent partagés en six groupes; trois groupes furent chauffés à 49°, le premier pendant cinq minutes, le deuxième quinze minutes, le troisième trente minutes; les trois autres groupes furent chauffés à 55° respectivement pendant les mêmes temps. Puis tous les tubes furent ouverts et portés à l'étuve. Au bout de quelques jours, presque tous les tubes chauffés à 49° présentèrent des voiles, aucun des tubes chauffés à 55° n'en montrant encore; plus tard, tous les tubes chauffés à 49° en présentèrent, sauf un de ceux qui avaient été chauffés pendant trente minutes; quant aux tubes chauffés à 55°, un seul présentait un voile: c'était un de ceux qui avaient été chauffés cinq minutes.

Ainsi une température de 55° subie pendant quinze minutes tue le micro-organisme. Pour être plus sûr, il vaut mieux élever la température à 60°.

Dans une autre expérience, j'ai comparé la résistance de la semence vieille à celle de la semence jeune. Vingt-quatre petits tubes, semblables à ceux de la *fig.* 8, renfermant de l'eau de levûre sucrée stérile, furent répartis en deux groupes. Tous les tubes du premier groupe furentensemencés avec de la semence jeune, provenant d'une culture faite la veille; ceux du second groupe furentensemencés avec de la semence empruntée à une culture de deux ans et demi. Dans chaque groupe, quatre tubes furent chauffés pendant dix minutes à 53° et quatre à 54°,5; les quatre autres, non chauffés, restèrent comme témoins. Après le chauffage, tous les tubes furent ouverts, coiffés de petits chapeaux de verre flambés, et portés à l'étuve. Un mois après, les tubes non chauffés présentaient tous des voiles; parmi les tubes à semence jeune, ceux qui avaient été chauffés à 53° présentaient quatre voiles sur quatre, et ceux qui avaient été portés à 54°,5 seulement trois voiles sur quatre; les tubes à semence vieille étaient tous demeurés stériles. Ainsi la température de 53° avait tué la semence vieille, alors que la semence jeune avait résisté à celle de 54°,5. Dans cette expérience, la comparaison

des tubes témoins montra aussi une plus grande rapidité de développement pour la semence jeune que pour la semence vieille.

Il résulte de ces expériences que notre micro-organisme est tué par une exposition de dix minutes à 53° s'il est vieux et à 60° s'il est jeune.

V. — Durée de la vie du micro-organisme.

Quand notre micro-organisme se trouve dans un milieu mal approprié à son existence, la durée de sa vie est variable. Nous avons déjà vu que le vide ne le tue pas en quelques jours, mais le tue à la longue. Nous avons vu aussi que dans un liquide sucré sans craie la vie ne durait pas plus de cinq à six mois; mais alors on peut dire que l'organisme est mort de mort violente, puisqu'il n'a pas parcouru son évolution tout entière. Il en est tout autrement quand l'organisme est cultivé dans un milieu sucré en présence d'un excès d'oxygène et de craie. Je possède un ballon, bouché par un tube bourré de coton, qui contenait primitivement de l'eau de levûre sucrée et de la craie en excès, et qui a été ensemencé le 30 août 1877. Au bout d'un ou deux mois toute apparence de travail chimique a cessé d'exister dans ce ballon, mais la vie de l'organisme n'était pas éteinte; bientôt des prises microscopiques ont montré qu'il prenait la forme filamenteuse; ces filaments, semés dans du liquide de culture nouveau, reproduisaient, comme nous l'avons vu, des cellules ovales. Le 28 septembre 1880, je semai une goutte du liquide de ce ballon dans de l'eau de levûre sucrée: j'obtins un développement. Ainsi la vie s'est conservée pendant plus de trois ans.

Comment expliquer une si longue durée de la vie au sein d'un liquide épuisé, où l'on ne voit se produire aucun acte vital? On pourrait croire qu'il se forme à l'intérieur des cellules vieilles des spores durables, comme cela se voit chez les bacillus. Mais, outre que je n'en ai jamais pu découvrir au microscope, l'action comparée de la chaleur sur la semence jeune et sur la semence vieille rend cette hypothèse tout à fait invraisemblable. En effet, s'il se forme des spores, elles doivent exister en abondance dans la semence de deux ans et être rares ou absentes dans

la semence d'un jour; par conséquent, si les deux semences résistent inégalement à l'élévation de température, ce sera la semence vieille, contenant des spores, qui sera la plus résistante. Or nous avons vu qu'une exposition de dix minutes à 53° tue la semence de deux ans et ne tue pas la semence d'un jour. On ne peut donc pas admettre qu'il se forme à l'intérieur des cellules des spores plus résistantes que les cellules jeunes. Ainsi, dans un liquide en contact avec de la craie, quand la fermentation est terminée, les cellules conservent une vie très peu active et très durable, sans passer à l'état de spores.

VI. — Place du micro-organisme dans la classification.

Après avoir fait l'étude particulière de notre micro-organisme, il convient de rechercher quelle place il occupe au milieu de ceux qui sont connus. Rien dans la forme des cellules ne le distingue du *mycoderma aceti* étudié par M. Pasteur; les milieux de culture seuls diffèrent. Mais notre micro-organisme ne pourrait-il pas agir sur d'autres matières que sur le sucre? Divers essais m'ont fait voir qu'en effet le sucre n'est pas le seul corps qu'il puisse transformer; réservant pour un autre travail son action sur les différents corps, je m'occuperai seulement ici de celle qu'il exerce sur l'alcool (1), pour le comparer au *mycoderma aceti* de M. Pasteur.

J'ai fait le mélange alcoolique suivant :

Alcool à 36°	10 ^{cc}
Acide tartrique	0 ^{gr} , 2
Eau de levûre	»
Volume total	255 ^{cc}

Ce mélange fut chauffé à 100° dans des ballons fermés; puis les ballons, après avoir été ouverts et bouchés par des tubes bourrés de coton, furentensemencés avec mon micro-organisme pur, provenant d'un grand nombre de cultures successives dans de l'eau de levûre

(1) Je puis cependant affirmer dès maintenant que le même ferment agit aussi sur la quercite et la transforme en un acide que je me réserve d'étudier prochainement.

sucrée. Toutes les précautions nécessaires pour empêcher du *mycoderma aceti* étranger d'arriver sur mon liquide avaient donc été prises. Or un voile se forma lentement; les organismes prirent une forme un peu différente de celle de la semence; les cellules étaient plus grêles, plus serrées les unes contre les autres. Le liquide prit bientôt l'odeur du vinaigre, avec une acidité considérable (146 d'eau de chaux pour 20). A la distillation il fournit d'abord de l'alcool, puis un acide qui, neutralisé par l'ammoniaque, colorait en rouge le perchlorure de fer; ce même acide, neutralisé par de la potasse et chauffé avec de l'acide sulfurique et de l'alcool, dégagait l'odeur de l'éther acétique: c'était, par conséquent, de l'acide acétique.

J'avais donc obtenu la transformation de l'alcool en acide acétique au moyen de mon micro-organisme, habitué à vivre dans des liquides sucrés. Il avait gardé sa forme caractéristique de cellules ovales étran-glées en leur milieu, mais n'avait pas tout à fait le même aspect que dans l'eau de levûre sucrée; il paraissait moins gonflé, moins bien portant. Il est à remarquer qu'ici il supportait une acidité beaucoup plus grande que dans les cultures en présence du sucre.

J'ai recommencé la même expérience plusieurs fois, en variant le milieu alcoolique, avec le même succès. En prenant du vin blanc ou de la bière étendue d'eau j'obtenais une acidité finale beaucoup plus grande.

Voici une expérience faite avec du vin blanc. Deux cristallisoirs fermés par des disques de verre, après avoir été portés à 200° ou 300°, sont chargés de vin blanc stérilisé par la chaleur (chauffé à 65°). L'un estensemencé avec le micro-organisme provenant d'une culture dans l'eau de levûre sucrée; l'autre est conservé comme témoin. Le vin blancensemencé se couvre lentement d'un voile très mince; l'autre ne s'altère pas. Au bout de trois semaines, le premier exhale une odeur piquante de vinaigre. Son acidité est de 460 pour 20. L'acidité du vin blanc nonensemencé, mesurée en même temps, est de 52 pour 20. Retranchant cette acidité, qui appartenait au vin blanc, de l'acidité finale du vinaigre, on a pour reste 408, ce qui représente l'acidité produite par l'organisme.

L'acide ainsi obtenu est-il uniquement de l'acide acétique? Pour le savoir, j'ai employé la méthode si habilement appliquée par M. Fitz à l'étude des acides volatils qui prennent naissance dans les fermenta-

tions (1). J'ajoute au liquide acide un excès de craie et je distille quand l'effervescence a cessé. Il passe un peu d'alcool; en employant la pipette alcoométrique de M. Duclaux (2), je trouve qu'il restait 0,4 pour 100 d'alcool dans le vinaigre obtenu (ce nombre peut être un peu inexact, parce que le liquide distillé contenait un peu d'acide acétique, ce qui ne peut manquer de modifier le nombre de gouttes obtenu). L'alcool avait donc presque entièrement disparu. La craie avait été pesée avant cette distillation; celle qui reste est lavée, desséchée et pesée. De la perte de poids trouvée je déduis la quantité d'acide chlorhydrique nécessaire pour chasser tout l'acide; j'en ajoute au liquide une quantité un peu moindre pour être bien sûr de n'en pas avoir un excès; puis je distille, en ayant soin de rajouter de temps en temps de l'eau selon le besoin. Je partage la distillation en deux fractions. Je dose l'acidité de chaque fraction, puis je sature l'acide par de la chaux. Je filtre, j'évapore, je reprends par un peu d'eau et je filtre de nouveau. Enfin, connaissant l'acidité de chaque fraction, je calcule la quantité de nitrate d'argent nécessaire pour en précipiter tout l'acide (en supposant que ce soit de l'acide acétique); j'opère cette précipitation en deux fois; je lave et sèche les précipités, et j'en dose l'argent. Voici les résultats:

Première distillation.

	Poids d'argent pour 100.
Premier précipité	63,8
Deuxième précipité	64,7

Seconde distillation.

Précipité unique	64,5
----------------------------	------

Or l'acétate d'argent contient 64,7 pour 100 d'argent. L'acide obtenu est donc uniquement de l'acide acétique. En exécutant les mêmes opérations avec du vinaigre que j'avais prélevé dans une cuve d'une vinaigrerie d'Orléans, j'ai trouvé des nombres tout à fait semblables aux précédents.

(1) *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, t. XI, p. 44; 1878.

(2) *Recherches sur les vins (Annales de Chimie et de Physique*, 5^e série, t. III; 1874).

Pour voir si mon organisme agissait bien sur l'alcool de la même manière que le *mycoderma aceti*, j'ai préparé quatre ballons d'eau de levûre alcoolisée, fermés par du coton; les ballons n° 1 et n° 2 ont étéensemencés avec mon organisme venant de l'eau de levûre sucrée, et les ballons n° 3 et n° 4 avec du *mycoderma aceti* provenant de vin aigri, et purifié par plusieurs cultures dans des milieux alcooliques acides. Il se forma des voiles semblables dans les quatre ballons. Au bout de quinze jours, l'acidité fut mesurée dans un ballon de chaque série :

	Acidité trouvée.
Ballon n° 1.....	190 pour 20
» n° 3.....	155 »

Ces deux acidités sont peu différentes. L'odeur était celle du vinaigre dans les deux ballons.

Ainsi mon organisme agit sur l'alcool tout à fait comme le *mycoderma aceti*. Voyons maintenant si le *mycoderma aceti* peut agir sur le glucose comme mon organisme.

Je me suis procuré du *mycoderma aceti* de trois sources différentes. Le premier provenait de vin rouge aigri; il était associé primitivement à divers organismes étrangers. Plusieurs cultures successives dans de l'eau de levûre alcoolisée et fortement acidulée par de l'acide acétique l'amènèrent à l'état pur; ce mycoderme formait à la surface du liquide où on le cultivait un voile mince et peu tenace. Semé dans de l'eau de levûre sucrée, il se développa très rapidement en rendant la liqueur acide ⁽¹⁾. Quelquefois la première génération obtenue dans ce liquide sucré présentait des formes anormales (*fig. 10*), qui disparaissaient

Fig. 10.



dans les générations subséquentes. L'acidité produite n'était pas très considérable. Quand la culture avait lieu en présence de la craie, il se for-

(1) M. Pasteur (*Études sur la bière*, p. 124) a semé du *mycoderma aceti* sur du moût de raisin et du moût de bière; il a constaté que le mycoderme se développait, mais il n'a pas examiné le changement chimique qui en résultait pour le milieu sucré.

mait un sel de chaux cristallisé qui, au microscope, avait tout à fait l'aspect du sel que j'obtenais par l'action de mon organisme ordinaire.

Pour voir s'il y avait transformation progressive de l'un des deux organismes dans l'autre ou si les deux organismes étaient identiques, j'ai préparé quatre ballons d'eau de levûre sucrée avec craie et je les ai ensemencés respectivement avec les quatre semences suivantes :

- 1° Mon micro-organisme ordinaire;
- 2° Le même ayant acétifié de l'eau de levûre alcoolisée (huitième culture dans ce milieu);
- 3° Le *mycoderma aceti* provenant du vin;
- 4° Le même ayant vécu dans de l'eau de levûre sucrée (douzième culture dans ce milieu).

Au bout de sept semaines environ, j'ai dosé la chaux dissoute dans les quatre ballons, ainsi que le glucose disparu. Les rapports de ces deux quantités étaient peu différents pour les quatre ballons.

	Perte de glucose pour 100.	Chaux dissoute pour 100.	Rapport de la chaux dissoute au glucose disparu.
1	2,14	0,40	0,19
2	4,85	0,94	0,19
3	3,50	0,60	0,17
4	3,10	0,57	0,18

D'ailleurs les quatre liquides, abandonnés dans des cristallisoirs, ont donné des cristaux microscopiques de sel de chaux absolument semblables.

Cette comparaison montre que les quatre semences avaient exercé exactement la même action sur le liquide sucré. Ainsi, mon micro-organisme et le *mycoderma aceti* que j'avais tiré du vin ne se transformaient pas lentement l'un dans l'autre; la première culture du *mycoderma aceti* dans un milieu sucré présentait les mêmes caractères chimiques que la treizième, et ces caractères étaient les mêmes que ceux de la culture de mon micro-organisme, soit qu'il eût toujours vécu dans des milieux sucrés, soit qu'il eût été cultivé préalablement huit fois dans des milieux alcooliques, où il faisait fonction de ferment acétique. Par conséquent rien ne distinguait ces deux micro-organismes. Ils

avaient tous deux la double fonction d'acétifier l'alcool et de transformer le glucose en un acide qui sera étudié tout à l'heure.

Le second *mycoderma aceti* que j'ai employé à ces expériences provenait de la vinaigrerie de M. de Monvel, fabricant à Orléans, qui emploie le procédé Pasteur. Je prélevai sur une de ses cuves du mycoderme jeune, je le semai sur des liquides alcooliques stérilisés, et, de retour à Paris, je cultivai à plusieurs reprises l'organisme qui s'était développé. Il ne se comportait pas comme le mycoderme précédent. Il formait, à la surface des liquides où on le semait, une membrane tenace, d'abord mince, transparente et invisible, puis s'épaississant, devenant opaline et enfin complètement opaque. C'était alors une peau épaisse, presque impossible à déchirer. Les ensemencements étaient difficiles à pratiquer, parce qu'il n'y avait presque pas de cellules en dehors de cette peau et que, en plongeant une pointe ou un tube dans le liquide, on n'en pouvait souvent tirer que la peau tout entière ou rien.

Ce mycoderme fut semé sur de l'eau de levûre sucrée. Il s'y développa comme sur l'eau de levûre alcoolisée; même membrane, d'abord invisible, puis louche par places, et finalement blanche et très épaisse; grande difficulté à observer des cellules isolées au microscope. Le glucose fut acidifié; jamais je n'avais obtenu une si grande acidité: elle était, au bout de vingt jours, de 92 d'eau de chaux pour 20. Saturé par la chaux, le liquide abandonna des cristaux semblables à mon sel de chaux ordinaire. Dans un ballon contenant de l'eau de levûre sucrée et de la craie, le même mycoderme produisit du sel de chaux en abondance; je convertis ce sel en sel d'ammoniaque, que je fis cristalliser. La forme des cristaux observés au microscope était identique à celle de mon sel ordinaire d'ammoniaque; une mesure grossière donna 140° pour valeur de l'angle pa^2 . Or nous verrons bientôt que cet angle, dans le sel d'ammoniaque préparé au moyen de mon micro-organisme, est de $138^\circ 21'$. C'était donc bien le même sel.

Ainsi le rôle chimique était le même pour les deux micro-organismes; mais cette production considérable de matière extra-cellulaire, qui formait les membranes épaisses du mycoderme, établissait entre les deux êtres une différence morphologique dont j'ignore la valeur.

Enfin j'ai essayé du *mycoderma aceti* provenant d'une troisième source, d'une vinaigrerie de Paris où l'on emploie la méthode luxembourgeoise.

Des copeaux de hêtre en activité venant de cette vinaigrerie furent grattés, et le mycoderme dont ils étaient chargés fut semé dans de l'eau de levûre alcoolisée. Ce mycoderme se développa encore d'une manière particulière. Je vis d'abord se former des taches arrondies sur les parois du vase dans les profondeurs du liquide; puis il se développa dans le liquide de grosses masses glaireuses, et à la surface un voile épais et opaque. Au bout de trois cultures successives, convaincu par l'examen microscopique de la pureté de l'organisme, je le semai sur de l'eau de levûre sucrée. Il se développa de la même manière et produisit une acidité encore plus grande que toutes celles que j'avais obtenues précédemment : 110 d'eau de chaux pour 20.

Ainsi les trois mycodermes ont acidifié le sucre, exactement comme mon micro-organisme.

Faut-il conclure de ces expériences qu'il y a identité entre mon ferment du glucose et le *mycoderma aceti*? Remarquons qu'il y a plusieurs espèces de *mycoderma aceti*. Celui que j'ai tiré du vin, se développant toujours sous la forme d'un voile dénué de toute ténacité, soit qu'on le préservât de toute agitation, soit qu'on disloquât au contraire le voile et qu'on en submergeât les débris, paraît bien appartenir à une espèce distincte de celui qui venait des vinaigreries, et qui, dans toutes les cultures, prenait la forme glaireuse, quelque soin qu'on prit pour éviter la submersion des cellules. Au microscope, d'ailleurs, la forme ne paraissait pas la même; quand j'observais le mycoderme des vinaigreries, au lieu de cellules ovales étranglées, régulières, j'apercevais à grand'peine, au milieu d'une membrane semi-transparente, d'apparence à peu près homogène, quelques petits filaments étroits de forme plus ou moins arrondie.

Le mycoderme que j'ai tiré du vin paraît identique avec mon ferment du glucose, mais il se distingue morphologiquement de celui des vinaigreries. Ce dernier mycoderme a bien acidifié le glucose dans mes expériences, mais ce caractère physiologique commun ne suffit pas pour établir l'identité. D'ailleurs, je ne puis pas affirmer que tout *mycoderma aceti* est capable d'acidifier le glucose. Je crois même qu'il n'en est pas ainsi, car j'ai reçu une fois de M. Duclaux un organisme qui acétifiait l'alcool, et qui, semé dans l'eau de levûre sucrée, s'est développé sous des formes monstrueuses, sans produire la moindre trace d'acide.

Le micro-organisme que j'ai étudié doit donc être considéré comme

une espèce particulière rentrant dans le groupe des *mycoderma aceti*. Comme ce nom désigne des êtres qui ne sont pas définis autrement que par leur fonction chimique, et que, d'après les expériences précédentes, cette fonction chimique, au lieu d'être essentielle pour l'être qui la possède, est accidentelle, variable avec le milieu de culture, il me semble qu'il y a lieu de donner à l'espèce que j'ai étudiée un nom nouveau, choisi conformément aux habitudes de la nomenclature botanique. Or, si nous adoptons la classification de F. Cohn (1), les caractères de cet organisme le placent dans le genre *micrococcus*, défini de la manière suivante : « Cellules non colorées ou faiblement colorées, très petites, sphériques ou ovales, se divisant transversalement, de manière à former de courts chapelets de deux ou plusieurs articles, ou des familles de quatre cellules, ou des masses muqueuses, dénuées de mouvement propre (2). » Il est à remarquer que les dimensions de notre micro-organisme sont plus grandes que celles que Cohn attribue au genre *micrococcus*; en effet, d'après lui, les cellules de *micrococcus* n'atteignent pas 1 micromillimètre de largeur : or j'ai trouvé jusqu'à 3 micromillimètres. Mais ce n'est pas là un caractère important. Reste à choisir un nom d'espèce. Dans la classification de Cohn, les espèces du genre *micrococcus* sont nommées d'après leur rôle chimique; mais, dans le cas qui nous occupe, ce rôle, étant multiple, ne me paraît pas propre à déterminer le choix du nom. Nous aurons recours de préférence à un caractère morphologique. Comme les cellules affectent souvent une forme plus ou moins allongée, nous adopterons comme nom d'espèce celui d'*oblongus*. Nous appellerons donc cet organisme *micrococcus oblongus*. Le rôle chimique de ce *micrococcus*, impropre à lui fournir un nom, en sera néanmoins le caractère spécifique le plus précis et le plus important.

VII. — Procédés de culture.

La connaissance des caractères physiologiques de ce *micrococcus* va nous permettre d'exposer rationnellement les procédés de culture qui

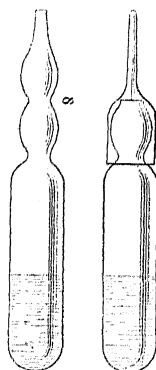
(1) *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, Band I, Heft 2, p. 127.

(2) *Loc. cit.*, p. 151.

lui sont applicables. On peut le cultiver, ou pour lui-même ou dans le but de préparer l'acide qu'il produit : les procédés de culture différeront dans ces deux cas.

Dans le premier cas, quand il s'agit simplement de provoquer une multiplication de cellules, par exemple de rajeunir de la semence, il est inutile que la fermentation soit poussée loin; nous n'ajouterons donc pas de craie au liquide. La première condition à remplir est d'avoir un liquide stérile, de préférence neutre, à l'intérieur d'un vase qui permette l'accès de l'air mais non de ses germes, et que l'on puisse facilement ouvrir ou fermer pour faire des prises microscopiques. Pour cela, je prends de petits tubes de 0^m,01 ou 0^m,02 de diamètre, ou davantage, fermés à un bout, terminés à l'autre par deux olives très faciles à faire à la lampe (*fig. 11*). Je verse dans ces tubes de

Fig. 11.



l'eau de levûre additionnée de glucose ou un autre mélange convenable. Je ferme les tubes à la lampe et je les chauffe à 115° dans un bain de chlorure de calcium pendant dix minutes. Quand les tubes sont refroidis, je les ouvre à l'étranglement α , dans la flamme d'une lampe à alcool pour éviter toute rentrée d'impuretés, puis je les ferme par l'un des procédés suivants.

Le plus simple consiste à coiffer le tube d'un autre tube un peu plus large, fermé à un bout, et qu'on vient de flamber à la lampe; si l'appareil ne doit pas, dans la suite, sortir de l'étuve à température constante, l'air ne sera jamais appelé à l'intérieur du tube que très len-

tement, et le petit chapeau suffira pour le dépouiller au passage de toutes ses poussières. Ce procédé m'a parfaitement réussi.

Voici cependant un autre procédé de fermeture qui peut donner plus de sécurité. J'ai préparé d'avance de petites ampoules de verre terminées aux deux extrémités par des tubes étirés, dont l'un est courbé en col de cygne (*fig. 12*). Au moment de fermer les tubes à culture, je chauffe dans l'eau bouillante, acidulée par un peu d'acide chlorhydrique, des tubes de caoutchouc capables de s'adapter aux olives des tubes et à ces ampoules. Pour fermer un tube, je coupe en α et β les extrémités

Fig. 12.

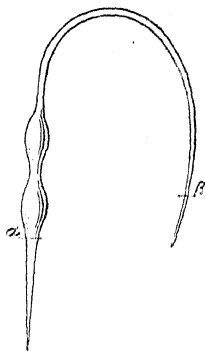


Fig. 13.

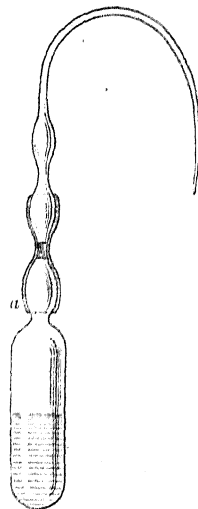


Fig. 14.

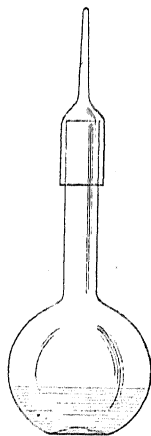


effilées d'une ampoule, je passe légèrement l'extrémité α dans la flamme, j'enfonce cette extrémité dans un des tubes de caoutchouc chauds, et j'adapte l'autre bout de ce caoutchouc à l'olive α du tube à culture. Ainsi le liquide n'est en communication avec l'extérieur que par un tube très fin et tournant son orifice vers le bas, comme dans les ballons à deux cols de M. Pasteur (*fig. 13*). Enfin je remplace souvent ces ampoules effilées par des tubes bourrés de coton, étirés aux deux bouts, mais ouverts primitivement à un bout seulement (O, *fig. 14*). Je chauffe d'avance ces tubes jusqu'à ce que le coton commence à jaunir; pendant le refroidissement, l'air rentre par l'extrémité ouverte, en se filtrant. Au

moment d'employer un de ces tubes comme bouchon, j'en coupe la seconde extrémité α , et c'est par ce côté que j'enfonce le tube dans le caoutchouc. On voit qu'ainsi aucune poussière ne pourra pénétrer dans le liquide. Ce procédé est le meilleur quand les tubes doivent supporter de grandes variations de température donnant lieu à de brusques appels d'air.

Au lieu de chauffer le liquide à 115° dans les tubes mêmes, on peut aussi, comme cela se pratique journellement au laboratoire de M. Pasteur, le chauffer en provision dans des ballons, avoir d'autre part de petites fioles flambées, fermées par des chapeaux de verre, et remplir ces fioles en puisant au moyen d'une pipette flambée le liquide dans les ballons (*fig. 15*). Je donne au col de ces fioles une hauteur suffisante pour qu'on puisse prendre les fioles par le col sans soulever le chapeau.

Fig. 15.



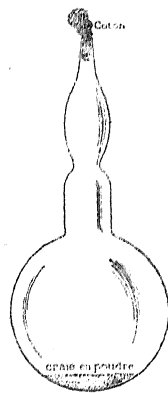
Nous avons un liquide stérile dans un vase convenable. Il s'agit de l'ensemencer. Pour cela, j'emploie les procédés habituels : je prends quelques gouttes du liquide d'une culture en activité avec une pipette flambée ; j'ouvre avec précaution le vase qui contient le liquide à ensemencer, j'y laisse tomber une goutte de semence, puis, après avoir passé dans la flamme ce qui sert de bouchon (chapeau, ampoule effilée ou tube à coton), je referme le vase. Comme dans les cultures peu avancées le *micrococcus* est sous forme de voile, on peut encore prendre la semence avec une fine baguette de verre plein, et la semer

en touchant du bout de cette baguette la surface du liquide; ce procédé peut être très utile, quand la semence n'est pas pure, si les impuretés se trouvent plutôt au fond du vase qu'à la surface libre du liquide.

Le vase, une fois ensemencé, est porté dans une étuve à 33° environ, et le développement a lieu rapidement. Autant que possible, c'est à l'intérieur de cette étuve que je fais les ensemencements. De cette façon, j'évite les appels d'air dus aux changements de température et je ne m'expose pas à faire entrer les poussières de l'air dans les vases au moment où je les ouvre.

Quand la culture du *micrococcus* a pour but la production de l'acide, nous avons vu qu'il y avait avantage à mettre de la craie en excès en contact avec le liquide. Quand j'opère en petit, c'est-à-dire sur 100^{cc} à 200^{cc} de liquide, je prends un ballon à long col au fond duquel je mets du blanc d'Espagne en poudre; puis j'en étire le col de la manière indiquée par la *fig. 16*, je bouche l'orifice par une bourre de coton, et

Fig. 16.

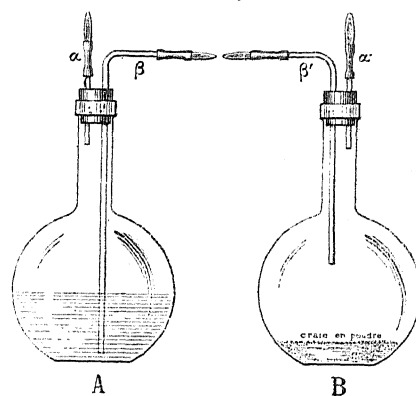


je porte le ballon à la température à laquelle le coton commence à jaunir; après le refroidissement, je verse le liquide de culture dans le ballon, je ferme celui-ci à la lampe au-dessus de l'olive, et je le chauffe un quart d'heure à 115° dans le bain de chlorure de calcium. Le flambage préalable du ballon avec sa craie n'est pas absolument indispensable, mais c'est une bonne précaution. J'achève les opérations exactement comme avec les petits tubes à culture dont je viens de parler.

Avec ce procédé, l'air n'est pas renouvelé autrement que par l'aspiration que produit à l'intérieur du ballon l'absorption d'oxygène, et par la lente diffusion des gaz à travers le coton ou à travers un orifice étroit. Quand j'opère sur d'assez grandes quantités de liquide, ce renouvellement est insuffisant; l'aspiration est bien proportionnelle à la quantité de liquide, mais la diffusion n'est pas plus rapide avec les grands vases qu'avec les petits, parce que les procédés de fermeture sont toujours les mêmes et qu'ainsi les orifices ont toujours les mêmes dimensions. Il faut alors, comme nous l'avons dit, renouveler l'air artificiellement, ce qui nécessite l'emploi d'un nouveau procédé. D'ailleurs, le précédent ne saurait être applicable à de grandes quantités de matière, parce que le chauffage de grands vases clos à 115° deviendrait trop dangereux.

Voici donc le procédé que j'emploie. Je prends deux fioles à peu près semblables, A et B (*fig. 17*). Je mets au fond de B une quantité de blanc

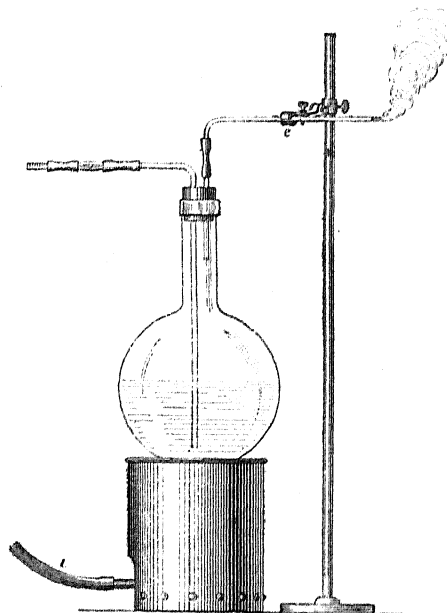
Fig. 17.



d'Espagne calculée de manière à être plus que suffisante pour saturer l'acide qui se formera. La fiole A, sans craie, est fermée par un bouchon de caoutchouc que traversent deux tubes de verre : l'un droit, α , ne pénètre que de quelques centimètres dans le col de la fiole; l'autre coudé, β , descend jusqu'au fond. Les extrémités extérieures de ces deux tubes portent, par l'intermédiaire de petits tubes de caoutchouc, des tubes de verre bourrés de coton. La fiole B, chargée de craie, porte des tubes α' et β' semblables à ceux de A, si ce n'est que le tube coudé

β' , au lieu d'arriver jusqu'au fond, ne descend qu'un peu au-dessous du col. Les deux fioles ainsi fermées sont placées dans une étuve que l'on chauffe jusqu'à ce que le caoutchouc commence à changer de couleur. La température est alors suffisante pour tuer tous les organismes présents dans les vases. Après le refroidissement, je bouche le tube β de la fiole A en ajustant au bout de son tube à coton un bouchon de verre par l'intermédiaire d'un tube de caoutchouc; puis, retirant le tube à coton de α , je verse dans la fiole, au moyen d'un entonnoir effilé préalablement flambé, un mélange de $\frac{1}{4}$ d'eau de levûre et de $\frac{3}{4}$ de glucose à 20 pour 100, additionné de 2^{gr} d'acide tartrique ou de 2^{cc} d'acide acétique cristallisable par litre. Dans cette opération, j'évite de répandre le liquide, qui n'est pas stérilisé, sur les parois supérieures de la fiole. Ensuite, retirant l'entonnoir, j'ajuste au caoutchouc de α un tube abducteur préalablement flambé (*e*, *fig.* 18), et je porte lentement le liquide

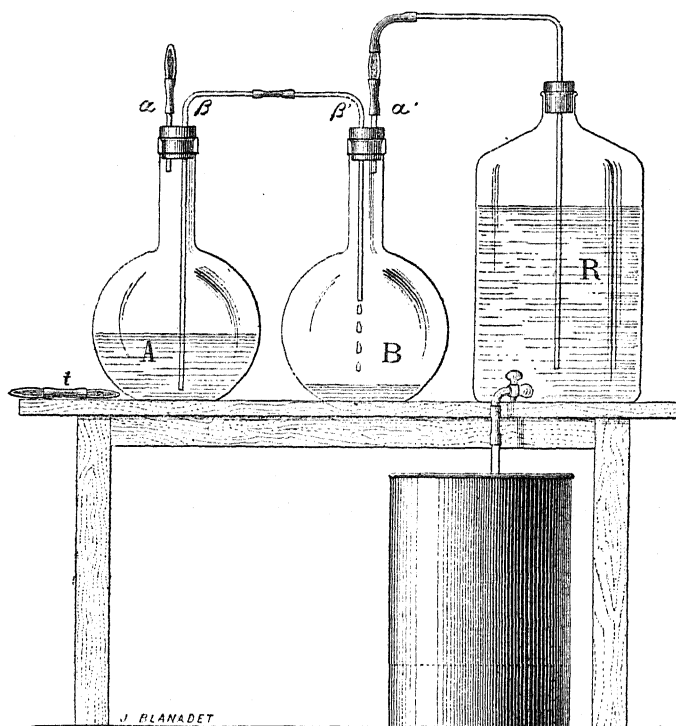
Fig. 18.



de la fiole A à l'ébullition. La vapeur s'échappe par le tube abducteur *e*. Après un quart d'heure d'ébullition, j'éteins le feu et en même temps

je remplace le tube abducteur par le tube à coton primitif; puis je débouche le tube à coton de β . Pendant le refroidissement l'air rentre filtré par les deux tubes à coton. Quand le liquide est entièrement refroidi, je le fais passer de la fiole A dans la fiole B de la manière suivante (*fig. 19*). Je retire le tube à coton de β' avec son caoutchouc

Fig. 19.



et le tube à coton de β sans son caoutchouc; j'adapte ce dernier tube à coton au caoutchouc de l'autre, comme on le voit en *t* dans la figure, de telle sorte que pendant la durée de l'opération les deux tubes à coton resteront à l'abri de toute impureté. Je réunis ensuite la fiole A à la fiole B en faisant entrer le tube β' dans le caoutchouc du tube β . Enfin je relie le tube à coton de a' à un aspirateur R. Il faut que tous les caoutchoucs et les bouchons soient bien serrés. Si cela n'était pas, on serrerait les caoutchoucs avec du fil de cuivre et on mastiquerait les bouchons avec

de la cire ou du mastic Golas. Enfin, ouvrant le robinet de l'aspirateur, on aspire le liquide de A et on le fait couler en B, jusqu'à ce que le niveau s'élève à peu près au milieu du vase, au-dessous de l'orifice du tube β' . On supprime alors la communication avec l'aspirateur, on attend que l'équilibre de pression s'établisse, puis, séparant les deux fioles, on rajuste aux tubes β et β' leurs tubes à coton.

Nous avons ainsi dans la fiole B un liquide pur de tout micro-organisme. En effet, le liquide de la fiole A, ayant une acidité notable (correspondant à plus de 10 d'eau de chaux pour 20), a été complètement stérilisé par l'ébullition. Les parties élevées du vase, qui auraient pu n'être chauffées qu'insuffisamment par la vapeur, et le tube β , où la vapeur n'a pas pénétré du tout, puisqu'il était fermé pendant l'ébullition, ont été purifiés par le chauffage préalable du vase vide. Enfin le transvasement s'est fait à l'abri de toute impureté. La craie de la fiole B va maintenant saturer l'acide du liquide, sans apporter de nouveaux germes, puisqu'elle a été préalablement chauffée. Si maintenant la fiole B est portée à l'étuve à 33°, l'expérience montre qu'en effet aucun développement ne s'y produit tant qu'on n'y a rien semé.

L'atmosphère intérieure de la fiole ne tarde pas à devenir pauvre en oxygène et riche en acide carbonique, à cause de l'action de l'acide ajouté sur la craie. Il est donc bon, même avant l'ensemencement, de faire passer un courant d'air permanent dans la fiole B. Pour cela il suffit de relier le tube β' à une trompe à eau, et le tube α' à un flacon laveur, contenant de l'eau, et destiné à saturer de vapeur d'eau l'air qui est constamment appelé dans la fiole. Cet air arrive non seulement humide, mais privé de tout organisme par son passage à travers le coton de α' .

Il s'agit maintenant d'ensemencer le liquide. On peut le faire, comme dans le cas des petites cultures, en introduisant par le tube α' quelques gouttes de semence empruntée, au moyen d'une pipette flambée, à une autre culture. Souvent, pour aller plus vite, j'ai mis beaucoup plus de semence. J'avais ensemencé préalablement une petite fiole préparée exactement comme la fiole A, mais ne contenant qu'une centaine de centimètres cubes de liquide. Cette fiole à semence avait été emplie à peu près comme la fiole B. Une fois le développement suffisamment avancé dans cette petite fiole, je l'agitais pour disperser les cellules

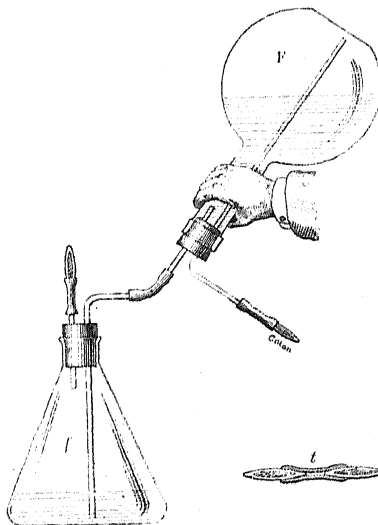
dans tout le liquide, puis j'en faisais passer le contenu dans la fiole B par le procédé qui avait servi à transvaser de A en B.

L'ensemencement fait, il ne reste plus qu'à laisser la fiole à la température constante de 33° et à entretenir constamment le courant d'air.

Il est facile de mener de front plusieurs de ces cultures. Pour cela on remplace la fiole A par une fiole beaucoup plus grande, pouvant contenir, par exemple, quatre fois la quantité de liquide nécessaire pour charger la fiole B. Une fois le liquide de A stérilisé, on emplit successivement quatre fioles B par le même procédé.

On peut aussi préparer à la fois un grand nombre de petites fioles à semence de la manière suivante. On a préparé 600^{cc} à 800^{cc} de liquide acide stérile dans une fiole F, semblable à la fiole A. On a d'autre part plusieurs petites fioles flambées *f*, contenant de la craie et portant deux tubes semblables à ceux de F. Pour opérer le remplissage d'une fiole *f*, on la relie à la fiole F comme l'indique la *fig.* 20, et, renversant la

Fig. 20.



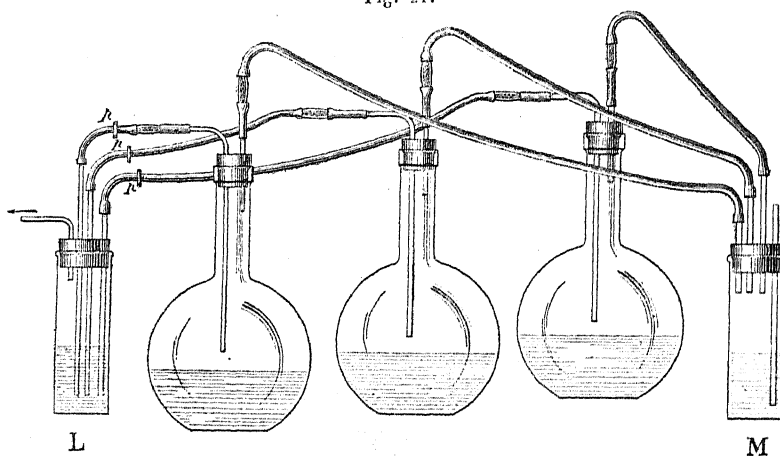
fiole F à la main, on verse la quantité de liquide que l'on veut. On détache la fiole *f*, en laissant le caoutchouc à la fiole F, et l'on ferme la fiole *f* avec le caoutchouc et le tube à coton d'une seconde petite fiole ;

on relie celle-ci à la grande et on l'emplit comme la première, et ainsi de suite. La dernière petite fiole sera fermée avec le caoutchouc et le tube à coton de la première, qui sont restés sur la table, en *z*, pendant toutes les opérations.

Pour ensemercer une fiole B, on y transvase le contenu d'une fiole *f*, soit par le même procédé, soit par aspiration, comme nous l'avons dit plus haut.

Pour faire passer un courant d'air dans les quatre fioles B avec une seule trompe, on les mettait toutes quatre en communication avec deux flacons laveurs munis de bouchons à cinq trous et placés dans l'étuve, à côté des fioles, comme l'indique la *fig. 21* (on n'a représenté que

Fig. 21.



trois fioles, pour plus de clarté). Dans le flacon laveur L, les quatre tubes communiquant avec les fioles plongeait dans l'eau; le cinquième, se terminant au-dessus du niveau de l'eau, était relié à la trompe. Dans le flacon laveur M, les quatre tubes communiquant avec les fioles se terminaient au-dessus du niveau de l'eau; le cinquième, plongeant dans l'eau, s'ouvrait à l'air extérieur. Des pincettes de Mohr à vis, *p, p*, adaptées aux tubes de caoutchouc qui se rendaient au flacon laveur L, permettaient de régler la vitesse du courant d'air dans chaque fiole isolément. Quand on faisait fonctionner la trompe, l'air appelé allait se saturer d'humidité en M, puis se distribuait à peu près également entre les quatre fioles, en se filtrant au passage dans leurs tubes

à coton. Au sortir des fioles, il allait barboter en L, ce qui permettait d'apprécier la vitesse du courant dans chacune des fioles et de régler cette vitesse au moyen des pinces. Enfin il se rendait à la trompe.

Tels sont les procédés qui ont été employés à la culture du micrococcus. Étudions maintenant les résultats de cette culture au point de vue chimique.

SECONDE PARTIE.

ÉTUDE DE L'ACTION CHIMIQUE EXERCÉE PAR LE FERMENT SUR LE GLUCOSE.

I. — Description du processus chimique de la fermentation.

Dans une culture comme celles que nous venons de décrire, au bout de trois ou quatre jours on aperçoit quelques bulles de gaz sous le voile de micrococcus, et, si l'on agite la craie qui est au fond du vase, il s'en dégage des bulles nombreuses d'acide carbonique. Ce gaz provient uniquement de la craie décomposée par l'acide produit, car dans les vases sans craie on ne voit jamais une bulle de gaz. L'agitation disloque le voile, mais il n'en paraît résulter aucun inconvénient. Il y a au contraire avantage à mêler les couches liquides, car autrement la craie n'agirait qu'au fond et les couches supérieures deviendraient très acides. Malgré la craie, le liquide a toujours, pendant la période d'activité, une acidité notable. Au bout de dix-huit à vingt jours environ, on n'observe plus de dégagement de gaz lorsqu'on agite la craie. L'action n'est cependant pas entièrement terminée. Vers le vingt-cinquième ou le vingt-sixième jour, si le liquide de culture contient les trois quarts de son volume de glucose à 20 pour 100, comme je l'ai supposé, il se dépose des cristaux au-dessus de la craie. En même temps, on constate souvent un nouveau dégagement de gaz pendant l'agitation. La couche de cristaux augmente d'épaisseur de jour en jour. Au

bout d'un mois environ, il n'y a plus aucun dégagement de gaz par l'agitation; les cristaux sont alors tellement abondants, qu'ils ne laissent au-dessus d'eux qu'une très petite épaisseur de liquide limpide. La fermentation est finie. Si l'on ouvre le vase, on sent une odeur particulière, assez faible, voisine de celle du lait. La saveur, nullement sucrée, est également un peu laiteuse et d'ailleurs peu prononcée.

II. — Produits de la fermentation.

Examinons de plus près les substances formées. Si l'on distille le liquide d'une fermentation faite en présence de la craie et terminée, il passe un liquide un peu odorant, mais ayant pourtant tout à fait l'apparence de l'eau. Une seconde distillation ne révèle pas trace d'alcool; seulement le liquide distillé a une saveur que l'on peut comparer à celle du rhum étendu d'eau. C'est de l'eau presque pure.

Pour voir s'il ne se serait pas produit quelque acide volatil, j'ai pris le flacon dont il a été question plus haut, où la fermentation, commencée en présence d'une petite quantité de craie, avait produit d'abord la dissolution complète de cette craie, puis une acidité de 112. J'ai ajouté à ce liquide acide une quantité d'acide chlorhydrique correspondant à un poids de craie certainement inférieur à celui de la craie disparue, de manière à chasser tout acide volatil qui aurait pu se trouver combiné à la chaux, sans cependant avoir un excès d'acide chlorhydrique; puis j'ai distillé ce mélange, dont le volume était de 100^{cc}. Au début de la distillation, on ne voit pas trace de gouttes huileuses attestant la présence de l'alcool; le liquide qui passe à la distillation est neutre au tournesol. Je recueille à part les 16 premiers centimètres cubes, et je les essaye à la pipette alcoométrique de M. Duclaux. Je trouve 103,5 gouttes à la température de 22° : le nombre relatif à l'eau pure serait de 102 gouttes. La différence est insignifiante. Il ne s'est donc produit ni alcool, ni acide volatil, ni aucune substance volatile quelconque en quantité appréciable.

Le liquide fermenté réduit toujours abondamment la liqueur de Fehling. Cependant nous avons vu que, additionné d'eau de levûre nouvelle, il n'est susceptible ni d'être acidifié par le micrococcus, ni de

subir la fermentation alcoolique sous l'influence de la levûre de bière. Ce n'est donc pas du glucose ordinaire qui reste, et cependant c'est un corps qui en diffère bien peu, car, en le considérant comme du glucose et en le dosant dans un liquide fermenté, soit par la liqueur de Fehling, soit au saccharimètre Soleil, j'ai trouvé à peu près la même teneur, savoir 2,6 pour 100 avec la liqueur de Fehling et 3,5 pour 100 avec le saccharimètre : c'est donc du glucose très légèrement modifié.

Le produit dont je me suis surtout occupé est cet acide qui, dans les cultures faites en présence de la craie, a déjà donné, pendant la fermentation même, des cristaux de sel de chaux. Ces cristaux sont très petits. On ne voit leur apparence cristalline qu'au microscope. Si l'on abandonne le liquide fermenté dans un cristalliseur à une température de 50° à 60°, pour qu'il ne puisse pas être altéré par de nouveaux micro-organismes, ou à la température ordinaire, mais après y avoir ajouté un peu d'acide phénique, on obtient des cristaux en choux-fleurs, d'un blanc un peu sale, semblables aux précédents, et montrant par le peu d'impuretés qui les souille qu'ils constituent bien le produit principal de la fermentation.

Il s'agit d'obtenir ce sel à l'état pur. Prenons une fiole dans laquelle la fermentation est finie : elle contient un liquide brunâtre, saturé du sel de chaux et assez riche en matière sucrée non fermentescible ; au fond se trouvent un reste de craie, des amas de micrococcus et une couche épaisse de cristaux de sel de chaux. En outre il y a, en dissolution ou dans le dépôt, une petite quantité d'acétate ou de tartrate de chaux provenant de l'acide qui avait été ajouté au liquide sucré primitif, en vue de la stérilisation par l'ébullition. Je commence par ajouter un peu d'eau et chauffer un peu au-dessous de la température d'ébullition pour dissoudre les cristaux ; puis je filtre la liqueur chaude. Si c'est de l'acide tartrique qui a été ajouté, je laisse refroidir et j'abandonne le liquide pendant une nuit ; le tartrate de chaux se dépose ; je le sépare par filtration. Si c'est de l'acide acétique, je ne prends aucune précaution ; l'acétate de chaux sera séparé par le reste du traitement, à cause de sa grande solubilité dans l'eau. Le liquide filtré est abandonné à la cristallisation dans une enceinte chauffée vers 60° ; l'évaporation est poussée jusqu'à consistance de pâte épaisse. Si elle a été poussée plus loin, la masse est broyée avec un peu d'eau dans un

mortier. La pâte obtenue est fortement pressée entre plusieurs doubles de papier buvard; il sort un liquide brun et il reste une galette plus blanche que la pâte primitive; cette galette est de nouveau broyée avec un peu d'eau et pressée; le même traitement est renouvelé jusqu'à ce que le liquide exprimé ne donne pas au papier buvard une coloration appréciable. A ce moment, les substances étrangères solubles dans l'eau ont à peu près complètement disparu. La masse est alors broyée avec de l'alcool à 70 pour 100 et additionnée d'une grande quantité de ce même alcool; le tout est porté à l'ébullition et filtré bouillant; le sel est lavé sur le filtre à l'alcool bouillant, à plusieurs reprises, jusqu'à ce que le liquide de lavage passe absolument incolore. Le sel est alors d'une pureté parfaite.

J'ai employé un autre procédé de purification qui donne aussi de bons résultats. J'ajoute au liquide brut un volume de sous-acétate de plomb, en dissolution concentrée, moindre que le volume du liquide. Dans ces conditions, le sous-acétate de plomb précipite diverses impuretés, mais ne précipite pas le sel de chaux. Je filtre: le liquide obtenu est parfaitement limpide, tandis que, lorsque je filtre le liquide brut, il passe trouble à travers le filtre. C'est que le précipité fourni par le sous-acétate de plomb entraîne les matières solides susceptibles de rester en suspension. Le plomb en excès est ensuite précipité par un courant d'acide sulfhydrique. Puis la liqueur filtrée, convenablement évaporée, est additionnée d'alcool fort. Si la proportion d'alcool n'est pas trop grande, le sel de chaux cristallise lentement, à l'état pur. Au bout de quelques jours la précipitation est terminée; une décantation et un lavage à l'alcool suffisent pour donner le sel pur. Si la précipitation est plus rapide, le sel est beaucoup moins pur.

III. — Préparation et propriétés des divers sels de l'acide obtenu.

Le sel de chaux obtenu ainsi est d'un blanc opaque, mais soyeux; il est cristallisé en fines aiguilles microscopiques, souvent rayonnantes, ou en très longs prismes terminés à angle droit; il se présente souvent aussi, au microscope, sous la forme de prismes gros et courts, terminés par des biseaux. L'eau en dissout à peu près 6 pour 100 à 15°;

ce sel est beaucoup plus soluble dans l'eau bouillante. Il est très peu soluble dans l'alcool; à froid, il ne se dissout que d'une manière insignifiante dans l'alcool à 50 pour 100; dans ce même alcool bouillant il se dissout assez bien; mais l'alcool à 70 et même 60 pour 100 n'en dissout que des traces à l'ébullition.

Au moyen du sel de chaux, il est facile de préparer tous les autres sels du même acide.

Sel d'ammoniaque. — Pour obtenir le sel d'ammoniaque, je fais une dissolution titrée de sel de chaux pur; or je sais, comme on le verra plus loin, que 224^{gr} de sel de chaux séché à 100° contiennent 28^{gr} de chaux. Je puis ainsi calculer la quantité d'acide oxalique normal qui doit être ajoutée au mélange pour chasser tout l'acide. Je porte donc la dissolution titrée de sel de chaux à une température voisine de l'ébullition; j'y ajoute un excès d'ammoniaque, puis la quantité calculée d'acide oxalique nécessaire pour précipiter toute la chaux; j'abandonne le tout pendant douze ou vingt-quatre heures, autant que possible dans un lieu chaud. Au bout de ce temps, je prélève un peu du liquide limpide au moyen d'une pipette, et je cherche si ce liquide précipite soit par l'acide oxalique, soit par le sel de chaux. S'il précipite par l'un ou l'autre, je chauffe de nouveau toute la masse et je rajoute, selon le besoin, de l'acide oxalique ou du sel de chaux jusqu'à ce que la liqueur ne précipite plus ni par l'un ni par l'autre. Il ne reste plus qu'à filtrer et évaporer à une température inférieure à 100°. Comme la chaleur altère le sel d'ammoniaque, je ne pousse pas loin l'évaporation; dès que la liqueur est assez concentrée, j'y verse goutte à goutte de l'alcool; le sel se précipite alors en fines aiguilles cristallines; je filtre et je laisse sécher les cristaux; j'obtiens une neige brillante de sel d'ammoniaque parfaitement pur.

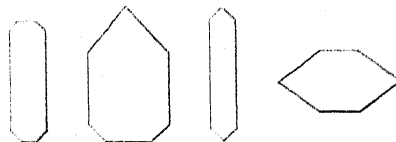
Au lieu d'opérer comme nous venons de dire avec des quantités pesées de sel de chaux et d'acide oxalique, on peut aussi prendre une dissolution non titrée de sel de chaux additionnée d'ammoniaque; on la partage en deux portions égales, on traite d'abord une moitié par l'acide oxalique ou l'oxalate d'ammoniaque en dissolution non titrée: on ajoute cette dissolution à la liqueur bouillante par petites portions mesurées, en essayant chaque fois s'il y a excès ou défaut de liqueur

oxalique; quand on en a mis un excès, on sait que cet excès est moindre que la dernière portion rajoutée; on mélange la seconde moitié de la dissolution de sel de chaux à la première; on partage de nouveau le liquide total en deux moitiés, et l'on traite la première moitié comme tout à l'heure, en profitant de la connaissance des limites de l'erreur données par la première opération. En recommençant plusieurs fois ce traitement, on resserre tellement les limites de l'erreur, qu'on finit bientôt par précipiter exactement toute la chaux sans mettre d'acide oxalique en excès. Le reste de la préparation se fait comme précédemment.

Le sel d'ammoniaque est extrêmement soluble dans l'eau; à 100° l'eau en dissout plus que son propre poids; par le refroidissement, une grande partie du sel dissous cristallise. Ce sel est insoluble dans l'alcool fort. L'alcool à 95 pour 100, mis en contact avec le dixième de son volume de dissolution aqueuse saturée, fait précipiter presque tout le sel immédiatement; si l'on filtre, la liqueur alcoolique continue ensuite à abandonner lentement quelques cristaux. L'alcool à 50 pour 100 bouillant dissout une quantité notable de ce sel.

Les cristaux de sel d'ammoniaque sont parfaitement transparents. Lorsqu'ils se produisent lentement au sein de leur dissolution aqueuse, ils se présentent d'abord sous la forme de tablettes extrêmement minces, allongées, comme le montre la *fig. 22*. Les tablettes prennent

Fig. 22.

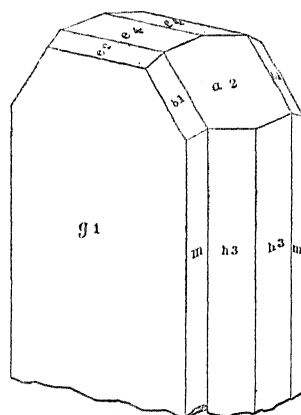


bientôt de l'épaisseur et deviennent à la longue des cristaux volumineux, qui se conservent à l'air sans s'effleurir ni tomber en déliquescence, et se prêtent parfaitement aux mesures goniométriques ⁽¹⁾. Ces cristaux sont des prismes orthorhombiques, où l'arête verticale aiguë g est remplacée par une face g^1 extrêmement développée; c'est

(¹) C'est pour moi un devoir et un plaisir de remercier ici M. P. Hautefeuille des conseils qu'il a bien voulu me donner, conseils qui m'ont été d'un grand secours dans cette étude cristallographique.

sur cette face que reposent les tablettes minces qui se forment au début de la cristallisation. L'arête verticale obtuse h est remplacée par deux facettes dont le symbole est h^3 , facettes peu développées, qui laissent subsister une partie des faces primitives m . Les arêtes horizontales b sont remplacées par des facettes b^1 , les angles solides a par des facettes a^2 ; les angles solides e portent deux modifications dont les symboles sont e^2 et e^4 ; les facettes b^1 , a^2 , e^2 et e^4 ne laissent rien sub-

Fig. 23.



sister de la face primitive p (fig. 23). Le rapport de l'arête basique à l'arête latérale est $\frac{b}{h} = 0,863$. L'angle du prisme est $mm = 98^{\circ}42'$. Calculant, au moyen des données d'observation les plus concordantes, les divers angles du cristal, j'ai obtenu les valeurs suivantes, en regard desquelles sont inscrites les valeurs observées directement :

Angles.	Calculé.	Observé (moyenne).
mm	$98^{\circ}.42'$	$98^{\circ}.40'$
$h^3 h^3$	133.32	133.12
pa^2	138.21	138.18
pe^2	142.38	142.36
pe^4	159.6	158.38
$b^1 a^2$	150.18	150.14

Quand on n'a que des cristaux microscopiques semblables à ceux de

la *fig.* 22, la mesure des angles plans qui terminent les tablettes fournit un caractère distinctif précieux pour reconnaître ce sel : en effet, ces angles sont égaux à pa^2 , ou à $270^\circ - pa^2$, ou à $2pa^2 - 180^\circ$. Il est donc facile de déduire de ces angles la valeur de pa^2 . Ce procédé nous a servi plus haut à reconnaître le sel d'ammoniaque.

Sel de baryte. — Du sel d'ammoniaque il est facile de passer au sel de baryte : il suffit de faire bouillir une dissolution assez étendue de sel d'ammoniaque avec un excès d'hydrate de baryte ; quand il ne se dégage plus d'ammoniaque, on fait passer un courant d'acide carbonique dans le liquide bouillant, pour précipiter l'excès de baryte, et l'on filtre. On évapore ensuite très lentement. Si l'évaporation est faite à une température un peu élevée, on n'obtient qu'une masse sirupeuse ; mais, à froid, le sel cristallise en plaques sans épaisseur appréciable, d'aspect nacré. Ces cristaux, visibles à l'œil nu, présentent une large face parallélogramme dont l'angle aigu est d'environ 78° . La cristallisation est beaucoup plus rapide quand à la dissolution aqueuse on ajoute de l'alcool, mais les cristaux obtenus sont plus petits.

Comme nous l'avons vu, on peut aussi obtenir le sel de baryte directement en faisant une fermentation en présence du carbonate de baryte ; mais on n'en obtient ainsi que très peu à la fois.

Sel de strontiane. — Ce sel se prépare comme celui de baryte. Il cristallise en choux-fleurs opaques comme le sel de chaux.

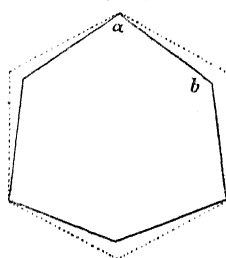
Sel de plomb. — J'ai également préparé le sel de plomb par le même procédé. Je commence par préparer de l'oxyde de plomb hydraté en précipitant le nitrate de plomb par l'ammoniaque, puis je fais bouillir très longtemps une dissolution de sel d'ammoniaque avec cet oxyde de plomb, en rajoutant de l'eau de temps en temps ; j'achève comme pour le sel de baryte.

Le sel de plomb obtenu est neutre au tournesol ; il cristallise très difficilement. Si dans la dissolution aqueuse concentrée on verse de l'alcool par petites portions, il se précipite des gouttes gommeuses qui tombent au fond et prennent au bout de quelque temps la structure cristalline : ce sont des amas de lames empilées de manière à former des masses à peu près sphériques ; vues au microscope, ces lames sont

ou des tables hexagonales régulières, ou des tables hexagonales dont les angles sont alternativement de 104° et de 136° environ (a et b , *fig. 24*), comme si ces cristaux provenaient de prismes hexagonaux réguliers où les arêtes latérales seraient remplacées par des biseaux. Le sel neutre de plomb est très soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool.

Il existe aussi un sous-sel de plomb que l'on obtient en ajoutant à une dissolution saturée de sel de chaux plus d'une fois son volume de sous-acétate de plomb en solution concentrée; le sel basique de plomb forme un précipité cailleboté, soluble soit dans un excès de sel de chaux, soit dans un excès de sous-acétate de plomb. Au bout d'un mois environ, ce précipité se transforme en un dépôt cristallin.

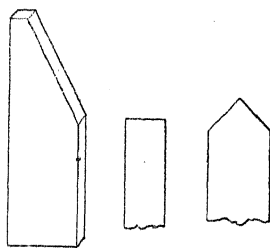
Fig. 24.



Sel de cadmium. — On obtient ce sel en traitant le sel de baryte par le sulfate de cadmium; j'ai employé la méthode des partages, qui a été décrite à l'occasion du sel d'ammoniaque. Pour que le précipité de sulfate de baryte soit facile à séparer, j'opère à une température voisine de 100° . Il est assez facile d'ajouter du premier coup au sel de baryte une quantité de sulfate de cadmium voisine de la quantité nécessaire, parce que, tant qu'il y a excès de sel de baryte, la liqueur reste laiteuse, et, à partir du moment où il y a excès de sulfate, le précipité se dépose rapidement et laisse une liqueur parfaitement limpide. A la fin de l'opération, quand on a atteint exactement les proportions nécessaires, le sulfate de baryte est en particules si ténues, qu'il devient à peu près impossible de les séparer par filtration. Je place alors la liqueur trouble dans un grand tube large, fermé à un bout, maintenu verticalement, et je l'y abandonne pendant une nuit; le lendemain, tout le précipité est tombé au fond du tube; il suffit de décanter à l'aide d'un siphon pour avoir le sel de cadmium pur.

Ce sel cristallise assez difficilement. Je commence par concentrer la liqueur par évaporation, puis j'y ajoute de l'alcool jusqu'à l'apparition d'un trouble permanent. Au bout d'un certain temps le précipité se dépose sous la forme cristalline et le liquide est limpide; je rajoute une petite portion d'alcool, et ainsi de suite jusqu'à ce que l'addition d'alcool ne produise plus de précipité. J'obtiens ainsi de petits cristaux prismatiques disposés en pompons hémisphériques. Au microscope, ces cristaux se présentent sous la forme de prismes terminés le plus souvent par des angles droits (*fig. 25*).

Fig. 25.



Sel de zinc. — Ce sel se prépare comme le précédent. Il forme des cristaux indistincts pour l'œil, opaques, présentant au microscope l'aspect de longues aiguilles prismatiques, rayonnantes, terminées par des sections obliques.

Sels de fer et de cuivre. — Les sels de protoxyde de fer et de cuivre se préparent exactement de la même manière; je n'ai pu obtenir ni l'un ni l'autre à l'état cristallin.

Sel de magnésie. — Ce sel pourrait se préparer au moyen du sel d'ammoniaque; mais il est facile de l'obtenir directement par la fermentation, comme le sel de chaux. Le même procédé de purification lui est applicable. Il faut seulement employer, pour le lavage des cristaux, de l'alcool un peu plus fort, parce que ce sel est plus soluble dans l'alcool étendu que le sel de chaux. L'alcool à 70 pour 100 bouillant en dissout une quantité notable, qui cristallise par le refroidissement.

Ce sel cristallise en fines aiguilles présentant au microscope l'aspect

de tables rectangulaires sans modifications, avec une disposition ordinairement rayonnante.

Sels de potasse et de soude. — On les prépare en saturant l'acide libre par l'alcali ou le carbonate alcalin. Je ne les ai pas obtenus à l'état cristallisé.

Préparation de l'acide. — J'ai préparé l'acide de deux manières différentes. Dans la première méthode, je dissous dans l'eau un poids connu de sel de chaux. Je connais la quantité d'acide oxalique normal nécessaire pour précipiter toute la chaux; j'ajoute à la dissolution chaude de sel de chaux une quantité d'acide normal un peu moindre que cette quantité calculée. La chaux ne peut pas être entièrement précipitée, parce que l'oxalate de chaux est un peu soluble dans les acides. Je filtre la liqueur et je l'évapore. J'ajoute au résidu de l'alcool à 92 pour 100, et je laisse digérer pendant plusieurs jours. Les sels qui étaient restés en dissolution dans l'eau et qui subsistent dans le résidu de l'évaporation ne peuvent se dissoudre dans l'alcool; l'acide seul s'y dissout. Je filtre cette dissolution alcoolique: elle ne contient pas de sel, car, évaporée et brûlée sur une lame de platine, elle ne laisse pas trace de cendre. Malheureusement je n'ai pas réussi à tirer l'acide de sa solution alcoolique sans l'altérer un peu; pendant l'évaporation, même à froid dans le vide, il paraît se former un éther; le résidu est un peu brunâtre et porte une odeur forte, différente de celle de l'alcool.

Le second procédé consiste à faire passer un courant d'acide sulfhydrique dans la dissolution de sel de cadmium, à filtrer et à évaporer dans le vide. On obtient ainsi un sirop épais, incolore et inodore, incristallisable. On pourrait remplacer le sel de cadmium par le sel basique de plomb, qui est plus facile à préparer.

IV. — Propriétés générales de l'acide et de ses sels.

Tous les sels que j'ai obtenus sont solubles dans l'eau, sauf le sel basique de plomb; tous sont insolubles ou très peu solubles dans l'alcool. L'acide seul est très soluble dans l'alcool. Je n'ai trouvé aucun

pouvoir rotatoire ni au sel de chaux ni au sel d'ammoniaque, ce dernier étant pris en dissolution très concentrée.

L'acide se décompose facilement par la chaleur. Même à 58° on ne peut pas le dessécher sans le décomposer; il perd constamment de son poids et devient de plus en plus brun.

Lesel d'ammoniaque, maintenu à la température de l'eau bouillante, se décompose lentement. Il brunit d'abord; puis, à mesure que la couleur devient plus foncée, il perd la structure cristalline; il devient bientôt analogue à du caramel, puis tout à fait noir.

Les sels de chaux, de baryte, de cadmium résistent à la dessiccation à 100°. Mais vers 140° le sel de chaux brunit, sans avoir cessé de perdre de son poids; il est donc impossible de le dessécher complètement sans le décomposer.

Quand on porte l'acide ou l'un quelconque de ses sels à une température plus élevée, il noircit et se boursoufle comme le caramel.

L'action des autres sels sur ceux de l'acide dont il s'agit montre que cet acide est fortement réducteur. Il réduit le nitrate de sous-oxyde de mercure; quand on mélange les deux dissolutions, on observe d'abord un précipité blanc; puis il se dépose au fond du vase une poudre gris foncé qui, desséchée sur un filtre, se rassemble en une goutte de mercure. Il n'agit pas sur le sublimé corrosif. Il réduit également les sels d'argent et d'or. Ainsi, quand on fait bouillir dans un tube une dissolution d'un de ses sels avec du nitrate d'argent, il se produit pendant le refroidissement une coloration brune et il se dépose à la partie supérieure du liquide un miroir d'argent sur le verre. Avec le chlorure d'or on obtient une coloration verte intense, puis la liqueur se décolore entièrement et il se dépose un précipité noir. Avec la liqueur de Fehling j'ai obtenu des résultats singuliers: le sel d'ammoniaque, ajouté à la liqueur bouillante, n'y détermine aucune réduction; le sel de chaux n'y produit qu'un précipité blanc de tartrate de chaux; le sel de soude qu'on obtient en précipitant le sel de chaux par du carbonate de soude en excès n'y produit non plus aucune réduction. Cependant l'acide libre que j'ai tiré du même sel d'ammoniaque ou du même sel de chaux produit une faible réduction de la liqueur de Fehling. Comme cette liqueur contient un excès de soude, il est impossible que l'acide libre agisse autrement sur elle que le sel de soude. Il faut donc admettre que la

réduction observée est due à une impureté. D'ailleurs, un dosage approximatif a montré qu'il fallait plus de 100^{gr} d'acide pour produire la réduction qui exige seulement 1^{gr} de glucose. Il y a donc lieu de croire que l'acide libre, moins stable que ses sels, se transforme partiellement en une matière qui réduit la liqueur de Fehling, mais que l'acide pur ne la réduit pas.

Cet acide s'oppose à certaines précipitations : que l'on verse dans une dissolution étendue de perchlorure de fer l'acide ou un de ses sels, on observe une coloration brune intense; si maintenant on ajoute de l'ammoniaque en excès, on n'obtient pas de précipité. Cette propriété a été constatée pour les acides tartrique, malique et citrique, pour l'albumine et pour le sucre (1). Si à une dissolution d'azotate neutre de bismuth dans l'acide azotique étendu on ajoute du sel d'ammoniaque ou de chaux, il ne se produit pas de précipité, tandis qu'un égal volume d'eau pure produirait un abondant précipité de sous-nitrate de bismuth. Au mélange des deux sels on peut ensuite ajouter de l'eau sans qu'il se produise de précipité. Les cristaux de nitrate de bismuth se dissolvent abondamment, sans aucun précipité, dans une dissolution du sel de chaux à 6 pour 100. La dissolution mélangée ainsi obtenue, très riche en sel de bismuth, ne précipite pas par l'eau.

Les propriétés qui viennent d'être décrites permettent de distinguer facilement cet acide d'un autre acide qui se trouve souvent dans les liquides sucrés fermentés, et avec lequel on pourrait pour cette raison le confondre, de l'acide lactique. Le lactate de chaux, très peu soluble dans l'alcool froid, se dissout en toutes proportions dans l'alcool bouillant. Or notre sel de chaux ne se dissout presque pas, même dans

Fig. 26.



l'alcool à 60 pour 100 bouillant. L'acide lactique n'a pas les propriétés réductrices de notre acide; il n'empêche pas non plus la précipitation

(1) RIFFARD, *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. LXXVII, p. 1103.

du perchlorure de fer par l'ammoniaque ni celle du nitrate de bismuth par l'eau. Enfin le lactate d'ammoniaque cristallise difficilement; les cristaux qu'il fournit ont la forme représentée *fig. 26*, forme paraissant appartenir au système clinorhombique avec les modifications e^x et peut-être g^1 , très différente par conséquent de celle de notre sel d'ammoniaque; ces cristaux sont extrêmement déliquescents, tandis que les cristaux de notre sel d'ammoniaque se conservent à l'air sans modification.

V. — Composition élémentaire et nature de l'acide.

Pour trouver la composition élémentaire de l'acide, j'ai analysé cet acide lui-même et plusieurs de ses sels.

Analyse de l'acide libre. — L'analyse de l'acide libre présente quelque difficulté, parce que cet acide a une consistance gommeuse et qu'on ne peut pas employer la chaleur pour le dessécher; il en résulte quelque incertitude sur la quantité d'eau de composition qu'il contient.

J'ai opéré la combustion de 0^{gr},6255 d'acide préparé par le sel de cadmium et l'hydrogène sulfuré, desséché dans le vide à froid sur l'acide sulfurique. L'acide était placé dans une nacelle de platine; la combustion a été faite par l'oxygène gazeux dans un tube à oxyde de cuivre. J'ai obtenu ainsi :

Carbone pour 100.....	36,52
Hydrogène »	5,94

Ce résultat amène à prendre pour formule de l'acide $C^{12}H^{12}O^{14}$, comme le montre la comparaison suivante :

	Observé.	Calculé.	Différence.
Carbone pour 100.....	36,52	36,73	0,21
Hydrogène »	5,94	6,12	0,18

Analyse du sel de chaux. — L'analyse du sel de chaux comporte deux opérations, le dosage de la chaux et celui des éléments combustibles.

J'ai dosé la chaux par trois procédés différents. L'un de ces procédés consiste à griller au rouge vif dans un moufle un poids connu de sel de chaux pur et sec. Il reste un mélange de chaux et de carbonate de chaux. Je reprends ce mélange par de l'acide nitrique titré (1^{cc} de cet acide saturait exactement 2^{cc} d'eau de chaux); j'ajoute de la teinture de tournesol; je fais bouillir avec un léger excès d'acide nitrique pour chasser complètement l'acide carbonique, puis, avec de l'eau de chaux, je rétablis la neutralité. Il ne reste plus qu'à titrer l'eau de chaux avec l'acide sulfurique normal décime pour calculer la teneur du sel en chaux. Le titre de l'eau de chaux saturée ne varie pas beaucoup; néanmoins ce titre était pris dans chaque expérience: il était toujours compris entre 21,5 et 22 d'eau de chaux pour 10 d'acide normal décime. J'ai trouvé par ce procédé, pour le poids de chaux contenu dans 100^{gr} du sel, les nombres 12,39 et 12,42.

Dans le second procédé, la chaux a été dosée au moyen de l'acide oxalique normal décime. J'ai préparé, d'après les données déjà acquises, une dissolution normale décime de sel de chaux; je la fais bouillir; j'ajoute de l'ammoniaque en excès, puis un volume d'acide oxalique normal décime égal au volume de dissolution du sel de chaux; je laisse reposer vingt-quatre heures, puis je décante et je cherche si le liquide précipite par le sel de chaux ou par l'acide oxalique. Dans l'expérience faite, il a fallu rajouter 1^{cc} d'acide normal décime pour que la liqueur ne précipitât plus ni par l'un ni par l'autre des deux réactifs. J'ai pu ainsi corriger la valeur supposée de l'équivalent du sel de chaux. J'ai trouvé, de cette manière, que 100 de sel de chaux contiennent 12,45 de chaux.

Enfin j'ai pesé la chaux à l'état de carbonate, en employant le traitement ordinaire par l'oxalate d'ammoniaque. J'ai obtenu cette fois 12,49 de chaux pour 100 de sel. Ce dernier résultat est certainement meilleur que les précédents, parce que la méthode qui l'a fourni est la plus sûre. On en déduit pour le poids de sel contenant 28 de chaux, c'est-à-dire pour l'équivalent du sel de chaux, le nombre 224.

Pour doser le carbone et l'hydrogène du sel de chaux, j'en ai opéré la combustion avec du chromate de plomb mélangé du dixième de son poids de bichromate de potasse. Dans cette combustion l'expérience montre que la chaux ne retient pas trace d'acide carbonique. Voici les

résultats de l'expérience, comparés à ceux qu'exigerait la formule $C^{12}H^{11}CaO^{14} + HO$:

	Observé.	Calculé.	Différence.
Carbone pour 100.....	32,04	32,14	0,10
Hydrogène »	5,27	5,36	0,09

Pour vérifier la teneur en hydrogène, j'ai fait une combustion du sel de chaux par l'oxygène pur, en plaçant le sel dans une nacelle de platine à l'entrée d'un tube à oxyde de cuivre. Ce procédé ne pouvait pas donner la teneur en carbone, parce qu'il reste dans la nacelle de la chaux plus ou moins carbonatée. J'ai trouvé ainsi 5,328 d'hydrogène pour 100 au lieu de 5,357 qu'exigerait la formule : la différence est bien faible. Nous pouvons donc attribuer au sel de chaux la formule $C^{12}H^{11}CaO^{14} + HO = 224$.

Analyse du sel d'ammoniaque. — J'ai dosé l'ammoniaque du sel d'ammoniaque de deux manières différentes. Dans les deux cas, j'ai chassé l'ammoniaque d'un poids connu de sel en dissolution par la distillation en présence d'un lait de chaux ou de magnésie, avec l'appareil de Schløesing. Dans le premier cas, je recevais l'ammoniaque dans de l'acide chlorhydrique dilué en excès; je transformais le chlorhydrate formé en chloroplatinate que je desséchais et que je pesais; comme vérification, je calcinais ensuite le chloroplatinate et je pesais le résidu de platine. Dans le second cas, je recevais l'ammoniaque dans de l'acide sulfurique normal décime, dont je reprenais ensuite le titre avec de la potasse normale décime : la perte d'acidité faisait connaître le poids d'ammoniaque absorbé.

Par la première méthode, j'ai trouvé que le sel d'ammoniaque contenait 7,86 pour 100 d'ammoniaque. Par la seconde, j'ai trouvé 7,94 pour 100 : la formule $C^{12}H^{12}O^{14}$, AzH^3 exigerait 7,98 pour 100. Je puis donc adopter cette formule pour le sel d'ammoniaque.

Analyse des sels de baryte et de cadmium. — Dans le sel de baryte, la baryte a été dosée à l'état de sulfate. J'ai trouvé 27,8 de baryte pour 100 de sel : la formule $C^{12}H^{11}BaO^{14} + HO$ exigerait 28,1.

Enfin j'ai dosé le cadmium dans le sel de cadmium en le transformant en carbonate par précipitation au moyen du carbonate de soude, puis

en oxyde par la calcination du carbonate. J'ai trouvé 25,2 d'oxyde de cadmium pour 100 : la formule $C^{12}H^{11}CdO^{14}$ exigerait 25,5.

L'accord qui règne entre toutes ces analyses des sels confirme la formule $C^{12}H^{12}O^{14}$ qui a été trouvée par l'analyse de l'acide libre. Or cette formule est celle d'un acide que Hlasiwetz et Habermann ont obtenu en 1870⁽¹⁾ en faisant absorber du chlore à du glucose et remplaçant ensuite le chlore par de l'oxygène au moyen de l'oxyde d'argent. Ils ont appelé ce corps *acide gluconique*. Les propriétés qu'ils ont décrites comme caractéristiques de cet acide ne permettent cependant pas de l'identifier absolument avec celui que j'ai obtenu dans cette fermentation. En effet, l'acide gluconique « réduit la liqueur de Fehling comme le glucose⁽²⁾ », tandis que notre acide, à l'état libre, ne produit qu'une réduction insignifiante, évidemment due à une impureté, et, à l'état de sel de soude, ne produit pas trace de réduction. Je crois donc devoir donner un autre nom à l'acide que j'ai obtenu, et, pour rappeler son origine, je l'appellerai, au moins provisoirement, *acide zymogluconique*.

VI. — Formule de la transformation du glucose.

La composition du produit principal de notre fermentation étant connue, il y a lieu de chercher par quelle réaction chimique ce corps prend naissance. Pour cela, j'ai comparé d'abord le poids d'acide formé dans une fermentation au poids de sucre employé.

Pour obtenir le rapport de ces deux quantités, je faisais fermenter le liquide sucré en présence d'un excès de craie dans de petits ballons de 100^{cc} à 200^{cc}, bouchés par des tubes à coton. Le titre de la liqueur sucrée primitive était connu. Je mesurais le titre après l'achèvement de la fermentation. Comme l'expérience a montré qu'il ne s'opérait pas une évaporation sensible, la comparaison de ces deux titres faisait connaître le poids de glucose disparu pour 100^{cc}. Malheureusement le dosage du glucose était toujours assez incertain, parce que la

⁽¹⁾ *Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. CLV, p. 123 (1870).

⁽²⁾ *Loc. cit.*, p. 126.

liqueur de Fehling est loin d'être réduite avec la même netteté par le liquide fermenté que par une dissolution de glucose pur. Il se produit, vers la fin de l'opération, des teintes vertes qui nuisent beaucoup à la sensibilité du dosage.

Pour doser la chaux, après m'être assuré par l'examen microscopique qu'il ne s'était pas déposé de cristaux de zymogluconate de chaux au fond du vase, je prélevais 5^{cc} de liquide, que j'évaporais; le résidu était grillé, et la chaux y était dosée par l'acide nitrique titré et l'eau de chaux, comme nous l'avons dit plus haut. Le poids d'acide était déduit de la teneur en chaux, d'après la formule $C^{12}H^{12}O^{14} = 196$. Voici les résultats obtenus :

	Perte de glucose pour 100.	Poids d'acide formé.
Première expérience (1)...	2,1	2,75
	4,8	6,5
	3,5	4,2
	3,1	3,95
Seconde expérience.	4,8	5,7
	5,1	5,7
	4,3	4,75

J'ai encore fait cette comparaison dans le cas où la fermentation était plus complète, c'est-à-dire dans le cas où j'employais des fioles de 2^{lit} à 3^{lit}, où je faisais passer un courant d'air permanent. Le même mode de dosage n'était plus applicable, parce que l'évaporation n'était plus négligeable, et surtout parce qu'il se déposait au fond de la fiole une grande quantité de zymogluconate de chaux cristallisé, de sorte que la composition du liquide surnageant n'était pas la même que celle de la masse totale. Dans ce cas, une fois la fermentation finie, je décantais la partie liquide, j'en mesurais le volume, et j'en dosais le sucre et la chaux; puis je lavais le dépôt avec de l'eau bouillante, en deux fois; chaque fois je mesurais le volume du liquide de lavage et j'en dosais le sucre et la chaux. Le poids primitif du glucose était connu d'avance:

(1) Expérience déjà citée (première Partie, VI).

je connaissais donc le poids total de glucose disparu et le poids de chaux dissoute. Dans deux expériences ainsi faites, j'ai trouvé :

Poids de glucose disparu.	Poids d'acide formé.
162 ^{gr}	152 ^{gr}
152 ^{gr}	167 ^{gr}

L'ensemble de ces résultats montre que le poids d'acide formé est un peu supérieur à celui du glucose employé. On peut donc admettre qu'il faut environ 1^{gr} de glucose pour faire 1^{gr} d'acide zymogluconique.

Nous avons vu que le micrococcus qui produit l'acide zymogluconique est essentiellement aérobie, et que, lorsqu'il vit en vase clos, tout l'oxygène présent est absorbé et remplacé par un volume moindre d'acide carbonique. Il s'agit maintenant de voir comment est employé cet oxygène. J'ai cherché s'il y avait un rapport constant entre le poids d'oxygène mis en œuvre et le poids d'acide produit. Pour cela, j'ai opéré des fermentations sans craie dans des vases clos contenant des proportions différentes de liquide sucré et d'air. Quatre ballons de capacités très différentes reçurent chacun 65^{cc} d'un même mélange d'eau de levûre et de glucose. Ils furent fermés, stérilisés par la chaleur, puis rouverts, ensemenés, refermés à la lampe et portés à l'étuve. Au bout de seize jours tous les ballons furent ouverts, et le volume de chacun d'eux fut mesuré, ainsi que l'acidité du liquide qu'il contenait.

Le calcul du volume primitif de l'oxygène était fait de la manière suivante. Soient V_l le volume du liquide et V_a celui de l'atmosphère confinée dans le ballon. Le volume primitif de l'oxygène se compose de l'oxygène libre et de l'oxygène dissous :

$$\begin{aligned} \text{Oxygène libre, ramené à la pression atmosphérique.} & \quad \frac{21}{100} V_a, \\ \text{Oxygène dissous.} & \quad V_l \times 0,04 \frac{21}{100}, \end{aligned}$$

en prenant 0,04 pour coefficient de solubilité de l'oxygène dans le liquid ;

$$\text{Volume total de l'oxygène.} \quad \dots \quad 0,21 (V_a + 0,04 V_l)$$

Voici les résultats obtenus :

V_a	Oxygène disponible.	Acidité produite mesurée en eau de chaux.	Acidité pour 1 ^{cc} d'oxygène.
309,2 ^{cc}	65,5 ^{cc}	61,5 ^{cc}	0,91
177,2	37,8	40,0	1,00
78,2	17,0	19,5	1,14
45,7	10,1	13,0	1,29

Il y a donc eu à peu près proportionnalité entre le volume d'oxygène disponible et le poids d'acide produit; cependant la production d'acide a été relativement plus grande dans les vases où il y avait moins d'air. Plus l'oxygène est rare, mieux il est utilisé.

Mais nous savons que l'oxygène n'est pas employé uniquement à produire l'acide zymogluconique : une partie est convertie en acide carbonique. Mesurons maintenant la quantité d'oxygène spécialement utilisée à la production de l'acide zymogluconique. Pour cela j'ai fait, comme dans l'expérience précédente, des fermentations sans craie en vase clos. Quand j'étais sûr que tout l'oxygène devait avoir disparu, les ballons étaient ouverts sur la cuve à mercure, une portion du gaz en était prélevée et analysée; puis on mesurait le volume du liquide et celui du ballon; enfin on dosait l'acidité du liquide.

Désignons, comme tout à l'heure, par V_l le volume du liquide et par V_a celui de l'atmosphère confinée du ballon; soient en outre $\frac{c}{a}$ le rapport des volumes d'acide carbonique et d'azote fourni par l'analyse du gaz final, et t la température du laboratoire.

Le volume primitif de l'oxygène a encore pour expression

$$0,21(V_a + 0,04V_l).$$

Le volume final de l'acide carbonique se compose de même de deux parties : le gaz libre et le gaz dissous. Le volume de l'acide carbonique libre est la fraction $\frac{c}{a}$ du volume d'azote restant. Or le volume de l'azote n'a pas changé : c'est $0,79V_a$, d'où pour le volume d'acide carbonique libre

$$\frac{c}{a} 0,79V_a.$$

Pour l'acide carbonique dissous, nous admettrons que le liquide dissolvait son volume d'acide carbonique, ce qui a lieu pour l'eau à 15°, d'où, pour le volume d'acide carbonique dissous,

$$\frac{c}{a} 0,79 V_l.$$

Acide carbonique total :

$$0,79 \frac{c}{a} (V_a + V_l).$$

Si l'on veut mesurer l'oxygène employé à faire l'acide zymoglucosique, il faut retrancher de l'oxygène total celui qui a été transformé en acide carbonique. Or le volume d'oxygène employé à faire de l'acide carbonique est égal au volume d'acide carbonique produit, d'où, pour le volume d'oxygène employé à faire de l'acide zymoglucosique,

$$0,21(V_a + 0,04V_l) - 0,79 \frac{c}{a} (V_a + V_l).$$

On aura le poids de cet oxygène en multipliant son volume par $\frac{0,00143}{1 + \alpha t}$, 0,00143 étant le poids en grammes de 1^{cc} d'oxygène à 0°, d'où, pour le poids d'oxygène employé,

$$\frac{0,00143}{1 + \alpha t} \left[0,21(V_a + 0,04V_l) - 0,79 \frac{c}{a} (V_a + V_l) \right].$$

On connaît d'ailleurs l'acidité du liquide en équivalents au moyen des liqueurs titrées, sans avoir besoin de se servir de la formule de l'acide. On peut donc calculer le poids d'oxygène employé à faire 1^{eq} d'acide. Comme la mesure de l'acidité n'est pas très rigoureuse, je me suis dispensé des corrections de température pour les volumes V_a et V_l , corrections qui auraient été bien inférieures aux erreurs expérimentales.

Voici les nombres relatifs à une expérience faite par cette méthode :

Volume du ballon.....	109 ^{cc}
» du liquide	55

L'analyse du gaz final a donné les résultats suivants :

Gaz prélevé.....	25,5 ^{cc}
Après la potasse.....	24,6
Après l'acide pyrogallique.....	24,6

La température était d'environ 10°.

L'acidité finale était de 5^{cc} d'eau de chaux pour 20, d'où 13^{cc},7 pour le liquide total. Il fallait 21^{cc},5 de l'eau de chaux employée pour saturer 10^{cc} d'acide sulfurique normal décime.

Le calcul précédent, appliqué à ces données expérimentales, montre que 18^{gr} d'oxygène ont été employés à faire 1^{éq} d'acide zymogluconique.

Dans une autre expérience, le poids d'oxygène trouvé a été de 21^{gr}.

La mesure de l'oxygène employé à former l'acide zymogluconique a encore été faite par une autre méthode qui dispense de faire intervenir la solubilité des gaz. Des tubes semblables à ceux de la *fig. 6* reçoivent un mélange d'eau de levûre et de glucose stérilisé; je lesensemence, puis j'y fais le vide et j'y fais rentrer de l'oxygène pur sous une pression notée; je les ferme à la lampe et je les porte à l'étuve. Plusieurs jours après, j'extrais de chaque tube la totalité des gaz qu'il contient au moyen de la pompe à mercure; je fais l'analyse de ces gaz et je mesure la capacité du tube, le volume du liquide contenu et l'acidité de ce liquide. Voici les résultats d'une semblable expérience faite avec un tube de 51^{cc},5, contenant 17^{cc},5 de liquide et empli d'oxygène sous la pression 546^{mm}. Le volume primitif de l'oxygène, ramené à la pression 760^{mm}, était de 23^{cc}. Après la fermentation l'analyse a donné 5^{cc},5 d'acide carbonique et 0^{cc},5 d'air, évidemment introduit pendant les manipulations. L'acidité totale était de 26^{cc},25 d'eau de chaux. On en déduit que 20^{gr} d'oxygène ont été employés à produire 1^{éq} d'acide zymogluconique. Il résulte donc de toutes les expériences faites qu'il faut un peu plus de 2^{éq} d'oxygène pour faire 1^{éq} d'acide.

Ainsi la formation de 1^{éq} d'acide zymogluconique correspond à la destruction d'environ 1^{éq} de glucose et à l'absorption d'environ 2^{éq} d'oxygène. La réaction fondamentale est donc une simple oxydation : $C^{12}H^{12}O^{12} + O^2 = C^{12}H^{12}O^{14}$. Quant à la petite quantité d'acide carbo-

nique dégagée, on peut admettre qu'elle est fournie par la respiration du micrococcus. D'ailleurs il est probable qu'il se fait, en même temps que la réaction principale, quelques réactions accessoires qui ne mettent en œuvre qu'une très petite portion du glucose présent.

VII. — Comparaison de cette fermentation avec les autres.

La transformation du glucose en acide zymogluconique sous l'influence du *Micrococcus oblongus* n'est pas une fermentation proprement dite, si nous réservons ce mot, dans son sens strict, pour les modifications profondes, accompagnées de dégagement de gaz, que subissent les matières fermentescibles sous l'influence des micro-organismes : c'est une simple combustion partielle, aboutissant à la formation d'un composé peu différent de la matière première. L'organisme qui la produit, au lieu d'être anaérobie, comme dans le cas des fermentations avec dégagement de gaz, est essentiellement aérobie. Cette transformation doit donc être rapprochée de la fermentation acétique de l'alcool ou de la fermentation ammoniacale de l'urée. On sait que dans cette dernière le micro-organisme n'agit pas directement sur la matière fermentescible ; il sécrète une substance soluble, une diastase, capable d'opérer la transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque en l'absence des cellules qui la produisent. Il m'a paru utile de rechercher si le *Micrococcus oblongus* ne sécréterait pas aussi une diastase capable de transformer le glucose en acide zymogluconique.

J'ai profité de la facilité avec laquelle le micrococcus se développe sur l'eau de levûre sans glucose, pensant que dans ces conditions la diastase, ne pouvant être utilisée à mesure qu'elle se produirait, s'accumulerait dans le liquide. J'ai doncensemencé de l'eau de levûre ; au bout de cinq jours, après avoir constaté l'abondance et la pureté du développement, j'ai filtré le liquide avec un filtre de plâtre tel que ceux qu'employait alors M. Pasteur ; j'ai recueilli environ 8^{cc} de liquide filtré ; puis, supprimant le filtre, j'ai introduit, avec les précautions nécessaires pour la pureté, 10^{cc} d'une dissolution de glucose à 12° B., et j'ai porté le vase à l'étuve. Dix jours après, la liqueur était restée parfaitement neutre et exempte de tout organisme. Par conséquent, l'eau de levûre

où avait vécu le micrococcus ne contenait aucun ferment soluble; privée par le filtre des cellules vivantes, elle était impropre à agir sur le glucose.

Ainsi le *Micrococcus oblongus* se montre, dans mes expériences, un simple agent d'oxydation, capable de transporter l'oxygène libre sur le glucose ou sur l'alcool pour déterminer une combustion partielle de ces deux corps.

C'est un ennemi redoutable pour le brasseur: il altère le moût de bière, dont il transforme le glucose en acide zymogluconique, reste vivant pendant la fermentation alcoolique, puis, celle-ci terminée, transforme la bière en vinaigre. Mais c'est un ennemi facile à détruire, puisqu'il ne résiste pas à une température de 60° maintenue pendant quelques minutes.