

Encyclopédie des Connaissances Pratiques

XV

JOERGENSEN

LES

MICROORGANISMES

DE LA

FERMENTATION



ECOLE CENTRALE DE LILLE



D0000003648

Paris

Société d'Éditions scientifiques

IRIS - LILLIAD - Université Lille 1



LES
MICROORGANISMES
DE LA
FERMENTATION

ENCYCLOPÉDIE DES CONNAISSANCES PRATIQUES

XII & XIII

LES

MICROORGANISMES

DE LA

FERMENTATION

PAR

ALFRED JOERGENSEN

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ET DE TECHNOLOGIE DES FERMENTATIONS,
COPENHAGUE

Traduit par **Paul FREUND**

ET REVISÉ PAR L'AUTEUR

Avec 79 illustrations dans le texte

DEUXIÈME ÉDITION FRANÇAISE REMANIÉE ET TRÈS AUGMENTÉE



PARIS

SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS SCIENTIFIQUES

PLACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

4, RUE ANTOINE-DUBOIS, 4

—
1899

Tous droits réservés

PRÉFACE

Le présent livre est un exposé de la morphologie et de la biologie des microorganismes qui se présentent dans les fermentations. Il forme donc, en quelque sorte, un supplément aux ouvrages qui s'occupent principalement de la partie chimique du sujet.

Je me suis proposé de donner, *sous une forme claire et précise, un aperçu général des connaissances acquises dans tout le domaine en question*, en tenant compte des différentes méthodes d'investigation qui, par la suite, sont devenues importantes.

Lorsqu'il est question des organismes de la fermentation et du rôle qui leur revient dans l'industrie, deux savants attirent tout particulièrement notre attention, à savoir *Pasteur*, au début de la littérature, et *Hansen*, dans la littérature moderne. Mon livre ayant, avant tout, pour but de traiter de *l'état actuel de la science*, les travaux du laboratoire de Carlsberg sont naturellement appelés à prendre une large place dans cet exposé. Ainsi les chapitres V et VI contiennent principalement une description exacte des recherches théoriques de *Hansen* sur les

ferments alcooliques, des méthodes pour la culture pure et l'analyse de la levure alcoolique, ainsi qu'un aperçu sur l'emploi pratique de son système et sur les résultats obtenus par cette voie dans les brasseries, distilleries et fabriques de levure pressée, dans la fermentation du vin de raisin et de fruits.

J'ai fait également un rapide exposé des résultats théoriques et pratiques de l'application des ferments de culture pure dans les fermentations lactiques et autres analogues.

Ce livre s'adresse par conséquent tant aux chimistes, botanistes et biologistes, qu'aux ingénieurs qui s'occupent de ces branches de l'industrie.

Dans l'énumération de la littérature, j'ai donné un aperçu sur tous les ouvrages importants pouvant intéresser l'homme de science et le technicien.

Cette seconde édition se distingue essentiellement de la première ; elle a en effet été remaniée en bien des points et considérablement augmentée, vu le grand nombre d'observations et d'expériences faites pendant le cours de ces dernières années.

Je remplis un doux devoir en remerciant ici le traducteur, M. Paul Freund, de son grand travail fait avec un soin particulier et une intelligence rare.

ALFRED JOERGENSEN.

Copenhague, janvier 1899.

LES
MICROORGANISMES
DE LA FERMENTATION

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHES MICROSCOPIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

1. — Préparations microscopiques. — Colorations
et analyses microchimiques.

Le *microscope* sera toujours le principal auxiliaire dans l'étude des microorganismes, ceux-ci étant, à l'état d'individu, presque toujours invisibles à l'œil nu. C'est aux recherches purement microscopiques que nous devons les premières observations importantes sur la physiologie de la fermentation, et il n'y a que quelques dizaines d'années que les études biologiques et physiologiques s'y associèrent. Après que l'on eut établi avec une certaine probabilité, qu'une même espèce de microorganismes ne se produisait pas toujours sous la même forme, un travail actif commença dans différents laboratoires, avec ce que l'on est convenu d'appeler des « *essais de culture* ». En modifiant artificiellement les conditions d'existence, on s'efforça d'étudier les différents degrés de développement d'une même espèce, afin d'en déterminer toutes les phases.

L'idée était juste, mais l'exécution tellement défectueuse à cette époque, que les « *essais de culture* » risquèrent de tomber complètement en défaveur. On opérait sans aucune critique, comme le montre l'exemple suivant : on sema de la levure de bière sur une tranche de pain humide, puis on couvrit soigneusement la culture d'une cloche en verre, en prenant toutes les précautions possibles pour garantir la végétation de tout corps étranger. Au bout de quelques jours, il se forma, comme cela a toujours lieu sur du pain humide, une couche de moisissures et l'on en conclut que la levure de bière était le point de départ des formes de moisissures et que par conséquent, la levure et les moisissures ne représentaient que différentes étapes dans le développement d'une seule et même espèce.

Il se passa plusieurs années avant que l'on comprit, ce qui aujourd'hui paraît tout naturel, qu'il est absolument indispensable, dans ce genre d'études, de se fixer exactement sur le *point de départ*, avant de procéder à aucune conclusion quelconque. Cette nécessité fut de plus en plus reconnue et nous verrons que l'on a réussi, dans le domaine qui nous occupe, à obtenir un degré de perfection plus élevé que dans les branches voisines de la science.

Pour l'étude des microorganismes, il sera généralement nécessaire d'employer un microscope d'un grossissement de mille fois. En ce qui concerne la levure et les moisissures, toute la préparation se réduit ordinairement à porter une goutte du liquide, dans lequel se trouvent les organismes, sur le porte-objet et de l'étendre en une couche mince au moyen du couvre-objet. S'ils ont été cultivés dans un milieu nourricier solide, on en délayera préalablement une très petite quantité dans une goutte d'eau. L'examen des bactéries doit, en tout cas, toujours commencer par cette opération. Dans l'étude moderne des

bactéries et notamment dans celle des formes pathogéniques, on emploie un grand nombre de *méthodes de dessiccation et de coloration*, tant pour faciliter les observations que pour donner naissance à des caractères qui, sans cela, ne pourraient être observés que difficilement, à supposer qu'ils puissent même l'être. A ces méthodes, on fit l'objection sans doute justifiée que ce traitement altérait souvent, chez les bactéries, certaines proportions, telles que celles de la longueur et de l'épaisseur, par exemple. D'un autre côté, il faut appuyer sur le fait, surtout en ce qui concerne certaines formes pathogéniques, telles que le *bacille de la tuberculose*, que, conformément aux observations de *Koch*, ce ne fut qu'une préparation de ce genre qui rendit possible la détermination certaine de ces organismes, et qu'une coloration est souvent indispensable pour découvrir les bacilles. A titre d'exemple pour les méthodes de coloration, examinons de plus près l'étude du bacille de la tuberculose, qui conduisit à une des observations les plus importantes de la médecine moderne. *Koch* indiqua la manière suivante : la tranche du tissu contenant les bacilles est immergée pendant 24 heures dans un mélange de 200 parties d'eau distillée, 1 partie de solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène et de 0,2 parties de potasse caustique en solution à 10 p. cent. Ce traitement la teint en bleu foncé et on la met ensuite pendant 15 minutes dans une solution aqueuse concentrée de vésuvine. Ensuite on la rince avec de l'eau distillée jusqu'à ce que la couleur bleue disparaisse en faisant place à une teinte plus ou moins brune ; enfin on déshydrate avec de l'alcool, on clarifie avec de l'huile de girofle, et la tranche se trouve ainsi prête pour l'examen microscopique. Les noyaux des cellules et la plupart des microcoques sont alors teints en brun, tandis que les bacilles de la tuberculose apparaissent d'un bleu intense. (De tous les bacilles connus il n'y a que celui de

la lèpre qui se comporte d'une façon analogue, mais il se distingue sous d'autres rapports, de celui de la tuberculose). D'après *Koch*, la réaction alcaline de la solution colorante était essentielle, car ces bacilles ne se colorent jamais dans des liqueurs acides ou neutres ; la solution neutre d'une autre matière colorante fait toujours disparaître la première coloration, excepté pour les bacilles de la tuberculose qui la conservent. — De toutes les méthodes proposées plus tard pour reconnaître ces microorganismes, c'est celle d'Ehrlich qui fut reconnue la plus parfaite. A la place de la potasse, il se servit de l'aniline, un liquide oléagineux, légèrement jaunâtre, qui, en solution aqueuse, a la propriété d'absorber plus de matière colorante que la potasse caustique. En outre, il employa pour la décoloration, des acides minéraux, partant de la supposition que les bacilles de la tuberculose étaient entourés d'une enveloppe ne laissant pénétrer que des liquides alcalins. Si donc les bacilles, les noyaux cellulaires, le protoplasma, etc., sont susceptibles de coloration par la solution alcaline, et si les premiers sont par conséquent difficiles à trouver dans ce mélange, un acide détruira la couleur dans toutes les autres parties et dans tous les autres microorganismes étrangers ; mais comme l'enveloppe présumée des bacilles de la tuberculose est imperméable pour des acides, ceux-ci resteront comme seuls corps colorés dans toute la préparation. Ehrlich pratique la coloration de la manière suivante : du violet de gentiane réduit en poudre fine est dissous dans une solution aqueuse d'aniline complètement saturée. On filtre 19 à 20 gouttes de cette solution dans un verre de montre, et l'on y laisse reposer la tranche à examiner pendant à peu près 24 heures, après quoi on la rince dans de l'eau distillée pour la replacer ensuite dans le verre de montre, dans un mélange de, par exemple, 3 parties d'acide nitrique et de 100 parties d'alcool. Au bout de 3 à 5 minutes, la

tranche se trouve décolorée, on la met dans de l'alcool et enfin on l'examine dans de l'huile de girofle.

Une nouvelle méthode permettant de reconnaître très vite la présence de ces bacilles si fréquents, a été indiquée par Gabbet: on verse sur la lamelle couvre-objet une forte solution phéniquée de fuchsine, que l'on chauffe pendant une demi-minute au-dessus d'une flamme, puis on décante la solution de fuchsine, et l'on ajoute quelques gouttes de bleu de méthylène en saturation dissous dans de l'acide sulfurique à 25 0/0. Dans l'espace de quelques heures, cette solution décolorera et recolorera la préparation qui est lavée et examinée dans l'eau.

Il est connu que dans les derniers temps, l'on s'est souvent servi de reproductions photographiques de bactéries introduites premièrement par Koch. Pour les préparer, les colorations et les décolorations sont absolument indispensables, d'une part pour faire ressortir plus vivement les contours des bactéries, d'une autre part pour éliminer tous les corps nuisibles à l'image.

La coloration et la décoloration ne sont ordinairement pas nécessaires pour l'étude physiologique de la fermentation, où les organismes sont la plupart du temps libres et rarement mêlés à des éléments gênants, et il n'y a que peu de cas où la coloration fit reconnaître des caractères spécifiques (*Bacterium aceti* et *B. Pasteurianum*).

Par contre, il est souvent nécessaire, dans l'étude des organismes de la fermentation et surtout dans celle des bactéries, d'appliquer un autre mode de préparation. Les *sécrétions* tant de nature organique que de nature inorganique, qui apparaissent dans les liquides, ont souvent une *ressemblance frappante avec les différentes formes de bactéries*, et il est souvent extrêmement difficile ou impossible, même pour l'observateur le plus exercé, de déterminer avec certitude si les petits corps sphériques qui se trouvent dans le champ du microscope, sont des bacté-

ries sphériques ou des sécrétions du liquide. Dans ces cas douteux, il est convenable, avant d'entrer dans l'examen physiologique que nous décrirons plus tard, d'avoir recours aux *réactifs microchimiques*, qui donnent souvent des indications préliminaires très utiles. Dans la bière et en général dans les liquides nourriciers contenant des matières albumineuses, celles-ci se présentent souvent sous forme de sécrétions sphériques ou fibreuses; de même les granules d'amidon, les dextrines formées par l'amidon et enfin quelques parties intégrantes du houblon peuvent affecter la forme de petits corps sphériques. Une légère addition d'alcool, d'éther, de chloroforme, d'acide acétique, de soude, de potasse, etc., pourra donner quelques éclaircissements dans ce cas, les substances résineuses étant par exemple attaquées par les premiers, tandis que les sécrétions albumineuses le sont plus ou moins par les derniers. L'emploi de l'iode nous fera voir les granules d'amidon comme points bleus, tandis qu'il fera apparaître certaines dextrines en rouge.

Pour les organismes supérieurs de la fermentation, les levures et les moisissures, on se sert des colorations dans un autre but, savoir, pour reconnaître *quelles substances se trouvent dans la membrane ou dans la cavité cellulaire* pendant les différentes phases de la croissance. Si l'on ajoute par exemple du chlorure ferrique ou un autre sel de fer à des cellules qui contiennent du tannin, celles-ci se colorent en bleu noir ou en vert. On constata de cette manière que, pendant la première période de la fermentation, les cellules du *Saccharomyces cerevisiae* contenaient une quantité considérable de tannin. Dans de certaines conditions vitales des cellules de levure, leur plasma est coloré en brun violet par l'iode; cette coloration est une réaction du *glycogène* (voir au chapitre V). *Le noyau cellulaire*, qui, dans un grand nombre de champignons, peut être observé directement, n'est visible dans d'autres,

et parmi eux les levures, qu'après la fixation préalable du plasma au moyen de réactifs à action rapide (tels que l'alcool, l'acide picrique), suivi de l'emploi de certains colorants par exemple une solution d'hématoxyline.

2. — Etudes de morphologie et d'évolution à la table du microscope ; chambres humides.

Une connaissance vraiment approfondie des organismes de la fermentation ne peut être obtenue que par *l'étude biologique et physiologique*. Comme nous l'avons indiqué précédemment, il y a plusieurs années que l'on s'efforça de trouver des méthodes de ce genre. Cependant l'absence totale de critique dans l'exécution des expériences, les fit échouer complètement, et il s'opéra une réaction qui fut, entre autres, formulée dans le travail de Reess sur les *Saccharomyces* (1870) où celui-ci déclare formellement n'avoir pris aucune précaution pour obtenir des cultures pures ; c'est à tel point que ces cultures étaient tombées en défaveur. Pendant les années suivantes, la chose prit une autre tournure, aujourd'hui la microbiologie a acquis un développement considérable, et c'est peut-être un fait unique dans l'histoire des sciences, que, dans un si court espace de temps, une nouvelle méthode de recherches se soit non seulement frayé un chemin, mais qu'elle ait conduit dans la science pathologique et dans notre branche spéciale, à des résultats pratiques qui amenèrent une révolution dans plusieurs notions que l'on croyait établies d'une façon inébranlable.

L'étude biologique et physiologique des microorganismes a pour but d'approfondir la connaissance du développement et des phénomènes vitaux de ces êtres. Les

moyens à employer consisteront évidemment à fournir aux microorganismes des conditions de développement et de multiplication telles, qu'il soit possible de suivre les transformations progressives de l'organisme et des substances qui en sont influencées. Tant que l'on ne désire obtenir que *la connaissance des diverses formes* que l'organisme en question peut affecter pendant son développement, les conditions sont faciles à produire. Mais lorsqu'on demande une culture en grand d'individus dérivant tous d'une seule cellule de l'espèce, en vue d'obtenir, par des *expériences physiologiques, chimiques ou purement pratiques*, sur un plus grand nombre de ces organismes, des éclaircissements sur les relations qui relient leurs formes aux influences extérieures, ainsi que sur toute leur activité vitale, la chose devient beaucoup plus compliquée. Dans le premier cas, on n'exige qu'une culture dans laquelle l'organisme puisse se développer librement, sans s'inquiéter s'il s'y trouvent aussi d'autres individus ou espèces. Dans le dernier cas, *on exige une culture absolument pure.*

Il y a certains cas où les cultures de la première espèce fournissent des données, comme par exemple dans celui dont nous avons déjà parlé plus haut, où l'on a un liquide nourricier dans lequel des sécrétions de diverses espèces ont une ressemblance plus ou moins frappante avec certaines formes de bactéries, de sorte que l'examen microscopique seul ne peut pas nous instruire exactement sur la nature de ces petits corps. Alors on aura à résoudre par l'expérience la question de savoir si ces petits corps *sont susceptibles de se multiplier.*

Une goutte du liquide sera portée dans une chambre humide, par exemple dans celle de Ranvier (Fig. 1). Cet appareil s'obtient en pratiquant une très légère excavation au milieu d'un porte-objet ordinaire en cristal. Tout autour de cette excavation, on creuse une rainure plus pro-

fonde, destinée à recevoir de l'eau. La goutte du liquide nourricier, qui doit être très petite, est portée dans le milieu du petit renforcement et recouverte d'un couvre-objet dépassant la rainure, et que l'on colle avec de la

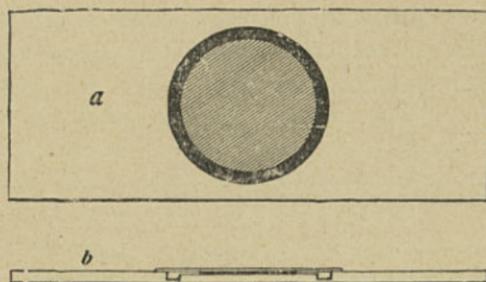


FIG. 1.

Chambre humide de Ranvier,

- a Vue d'en haut.
b Vue de côté.

vaseline. La goutte se trouve ainsi étendue sous le couvre-objet dans le renforcement du porte-objet et préservée contre l'évaporation par l'eau stérilisée qui est dans la rainure.

Une autre forme de chambre humide est celle de Böttcher (Fig. 2), que l'on obtient simplement en fixant un anneau en verre sur un porte-objet ordinaire. On met quelques gouttes d'eau stérilisée à l'intérieur, et l'on suspend la gouttelette du liquide nourricier contenant les organismes au couvre-objet qui s'applique sur le bord de l'anneau de verre avec de la vaseline.

On place un appareil de ce genre sous le microscope et l'on observe, de temps en temps, les transformations des corps, ou bien on l'introduit dans un thermostat à température convenable et constante, pour l'en sortir à des in-

intervalles déterminés, afin de le soumettre à l'examen microscopique.

Ces appareils sont donc construits pour des observations morphologiques ou botaniques à la table du microscope; mais, dès qu'il s'agit d'exécuter des recherches physiologiques, il faut que les cultures pures soient en même temps développées en culture en masse. Ce sont principalement *Pasteur*, *Lister*, *Koch* et *Hansen* qui ont développé la méthode

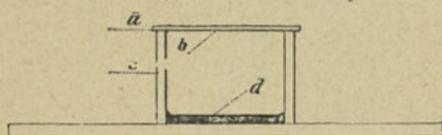


Fig. 2.

Chambre humide de *Böttcher*.

- a Couvre-objet.
- b Couche nutritive.
- c Anneau de verre.
- d Eau stérilisée.

des dans ce sens (Voir § 7 : La préparation de la culture pure).

Toute fermentation, soit qu'elle produise de la bière, du vin, de l'alcool, du vinai-

grè ou toute autre substance, dépend d'une végétation d'organismes vivants, de « ferments organisés », et, dans la pratique, l'industriel s'efforce d'obtenir une culture aussi pure que possible des formes les plus favorables à sa fabrication. Tout en ayant réalisé à notre époque, avec une connaissance plus approfondie des moyens et du but de ces travaux, de grands progrès, il y aura certainement toujours des limites que, pour des raisons purement pratiques, l'on ne pourra pas dépasser. Ainsi, dans la pratique, les cultures n'atteindront jamais le degré de « pureté absolue ». Mais c'est un des traits les plus saillants dans l'état actuel de l'industrie de la fermentation, que l'on soit arrivé, par l'intelligence exacte de l'importance des organismes qui s'y rapportent en tant qu'agents essentiels, à travailler en vue d'affranchir d'une manière toujours plus parfaite, les espèces vraiment actives et utiles de l'influence des formes nuisibles. L'importance capitale de cette dernière condition ne fut généra-

lement reconnue que lorsque Hansen démontra, par le choix méthodique des races de levure, qu'une végétation pure permettait une fabrication plus sûre et plus uniforme que les levures impures et inconnues employées jusqu'alors. Nous reviendrons plus tard sur ce point, au chapitre VI.

Pour les recherches faites au laboratoire, où il s'agit également de cultures des organismes de la fermentation, les exigences sont naturellement plus sévères que pour les expériences exécutées en pratique. Ce qu'on demande ici, c'est de travailler invariablement avec *des cultures absolument pures*, soit sur une petite échelle, soit avec des quantités telles, que les cultures puissent, à un moment donné, quitter le laboratoire pour être introduites dans l'exploitation industrielle. On cherche à réaliser, dans un laboratoire spécialement aménagé pour ce genre d'études, les conditions qui font défaut dans l'application technique. Nous allons les indiquer ainsi que la manière de les réaliser, en commençant, pour des motifs purement historiques, par le dernier article, c'est-à-dire par l'étude des récipients et des liquides destinés à recevoir la petite culture pure primitive, ainsi que les moyens employés pour l'élevage. Il est nécessaire, avant de recevoir l'ensemencement, que ces récipients et ces liquides soient *stérilisés*, c'est-à-dire rendus vierges de tout germe vivant ou susceptible de développement, et qu'en outre les autres appareils ainsi que l'air de la salle dans laquelle on travaille, contiennent le moins possible de germes vivants. La même remarque s'applique naturellement aussi aux mains et aux vêtements de l'opérateur.

3. — Stérilisation.

Les principes de toute la technique de la stérilisation, ainsi que les types d'appareils nécessaires, étaient déjà indiqués dans les anciens travaux sur la génération spontanée (*generatio æquivoca* ou *spontanea*).

En 1765, *Spallanzani* combattait déjà la doctrine soutenue par *Needham* et *Buffon*, à savoir que des êtres vivants pouvaient prendre naissance par génération spontanée dans des liquides ou d'autres substances en décomposition. *Spallanzani* chauffa de l'extrait de viande dans des ballons bouchés et démontra qu'il ne s'altérait pas jusqu'au moment où l'on donnait accès à l'air. Il en conclut que les germes qui se développaient à partir de ce moment dans les ballons débouchés, devaient provenir de l'air. Plus tard, en 1782, *Scheele* fit remarquer qu'en chauffant du vinaigre, on pouvait le conserver plus longtemps que sans cette opération. Toutefois, on ne tint aucun compte de sa découverte. En 1810, *Appert* publia son livre sur la conservation de plusieurs aliments et liquides au moyen de la chaleur. Dans la quatrième édition de son livre, qui parut en 1831, il donna des instructions précises sur la manière de traiter le vin, la bière et d'autres liquides, lesquelles répondent à celle que l'on emploie encore aujourd'hui, c'est-à-dire à la pasteurisation.

La période suivante, si riche en découvertes pour la microbiologie, produisit les travaux de *F. Schultze* (1836) et de *Th. Schwann* (1837). Ceux-ci prouvèrent que lorsque des liquides facilement altérables ont été soumis à une forte cuisson, ils restent stériles si l'on fait rentrer ensuite l'air par de l'acide sulfurique ou par des tubes rougis à la flamme. A la même époque, *Mitcherlich*, *Cagniard Latour*, *Schwann* et *Kützing* décrivirent les cé-

lules de la levure de bière et ce dernier en même temps les ferments acétiques. *Turpin* érigea, en 1838, la thèse si significative: « Point de décomposition de sucre, point de fermentation sans l'acte physiologique d'une végétation. »

Enfin, l'objection soulevée contre les expériences de Schulze et de Schwann, à savoir que l'air pénétrant dans les ballons, après avoir subi le traitement de l'acide sulfurique ou du tube rougi à la flamme, n'était plus en état de fournir des conditions suffisantes de croissance aux germes qui se trouvaient dans le liquide, fut définitivement écartée par les belles expériences de *Schroeder* et de *Dusch* (1854). Ces savants firent passer l'air par des filtres de ouate et arrivèrent au même résultat. Finalement, *Pasteur* démontra, en 1862, que si dans quelques essais, ces deux chercheurs trouvèrent encore des organismes vivants dans le liquide bouilli, cela provenait uniquement de ce que l'ébullition *n'avait pas été assez longtemps maintenue*.

Lorsque les principes pour toute la technique de la stérilisation furent ainsi établis, ces études acquirent un développement considérable et trouvèrent une vaste application tant en science qu'en pratique, grâce à *Pasteur* en particulier et à d'autres savants éminents qui s'y sont voués plus tard.

a. — Stérilisation d'objets en verre et en métal.

La stérilisation proprement dite doit toujours être précédée d'un nettoyage complet mécanique et quelquefois même chimique. Les objets dont on se sert journallement au laboratoire, tels que les spatules, les aiguilles, les fils de platine, etc., se chauffent directement dans la flamme, après quoi on les laisse refroidir dans un endroit exempt de germes. Il y a cependant beaucoup d'appareils qui ne supportent pas ce traitement; ceux-ci doivent alors être

stérilisés soit par voie humide, en les faisant cuire dans de la vapeur d'eau ou au bain-marie, soit dans l'air sec, au moyen de fours à stérilisation spécialement destinés à cet usage, où ils sont chauffés pendant une ou deux heures à 150° C. Les objets peuvent, selon leur nature, être placés directement dans le four à stérilisation, ou bien doivent être enveloppés dans du papier. Les orifices des ballons sont munis de tampons de ouate que l'on recouvre toujours de plusieurs feuilles de papier à filtrer.

b. — *Stérilisation des liquides nourriciers et milieu nourriciers solides.*

Les liquides nourriciers peuvent être stérilisés par filtration ou par chauffage. La *filtration* offre l'avantage de faire subir aux liquides moins de transformations que le chauffage, de sorte qu'ils se prêtent mieux au développement de beaucoup d'espèces de microorganismes. Pour que les filtres remplissent momentanément leur but, il faut que leurs pores soient donc plus petits que les plus petits microorganismes. On a employé dans ce but du plâtre, de l'asbeste, du charbon, de l'argile cuite et d'autres matières, en faisant passer par pression ou par aspiration les liquides à travers d'épaisses couches de ces matières. Les modèles dont on se sert le plus, sont le filtre en porcelaine de Chamberland et le filtre de silice en terre d'infusoires. Ils demandent cependant à être nettoyés fréquemment à leur surface et à être souvent stérilisés, car on a observé que les bactéries pouvaient, en peu de temps, croître par les pores du filtre, particulièrement si l'eau contient beaucoup de débris de corps organisés et que la température est favorable (1).

(1) Dans les dernières années, le *filtrage de la bière* s'est beaucoup répandu dans les brasseries ; comme matière filtrante

Les liquides et les milieux nourriciers solides sont, dans la plupart des cas, stérilisés par le *chauffage*. La manière dont cela doit se faire et la durée de l'action des températures élevées dépendent de la nature du milieu qui est à stériliser. On peut employer l'ébullition directe dans le bain de sable, comme par exemple pour la stérilisation du moût de bière dans le ballon de Pasteur, ou bien le bain-marie. Un moyen de stérilisation excellent pour

on emploie le papier, la cellulose, l'asbeste, etc. Si parfois on a l'avantage de débarrasser un liquide, d'ailleurs sain, de sécrétions de toute sorte et de le rendre limpide, il est incontestable que, par l'emploi irréflecti de la filtration, *on s'expose à de grands dangers*, ce qui a été directement prouvé par les expériences de *Thausing*. *Wichmann*, *Reinke*, *Lafar* et d'autres. Quand les filtres ne sont pas assez efficaces, il arrive facilement qu'ils ne retiennent que les cellules de levure, mais qu'ils laissent passer les bactéries; ces dernières peuvent alors agir d'autant plus énergiquement sur le liquide. Un autre grand danger est que le filtre peut devenir, par suite d'un nettoyage insuffisant, un foyer de germes les plus variés, qui infectent la bière passant au travers. Lorsqu'un seul foudre d'un chantier est infecté, et qu'après la filtration de cette bière le filtre n'est pas vraiment *stérilisé*, on pourra transmettre la maladie à toute la bière filtrée ensuite.

Le *filtrage de l'eau en grand* se fait ordinairement au moyen de *filtres à sable*, munis de plusieurs couches de pierres de différentes grosseurs. Un grand nombre de bactéries reste arrêté dans la masse glaireuse, déposée peu à peu par l'eau sur la couche supérieure, à condition toutefois que l'eau ne traverse pas trop rapidement le filtre, ce qui pourrait faire fendre la couche glaireuse. Au bout d'un certain temps, les bactéries croissent cependant dans le sable, dont on est alors obligé d'enlever une partie. On a remarqué que le filtre rendait beaucoup moins, quand la couche de sable n'avait pas au moins 50 centimètres d'épaisseur. Le débit de ce filtre varie beaucoup et dépend surtout de la nature de l'eau, des changements de sa température, et les différents essais que l'on a fait ont démontré, qu'il ne peut guère retenir une partie des germes plus que 2 ou 3 semaines.

cet usage est la vapeur d'eau, soit à l'état de courant sans pression, soit sous pression (110-120° C.), en employant *la marmite de Papin (autoclave)*. Pour le refroidissement, il faut prendre les précautions nécessaires, afin qu'il n'y ait que de l'air absolument pur qui rentre dans le récipient sur la substance stérilisée. Cela s'obtient en filtrant l'air rentrant à travers de la ouate ou à travers de tubes plusieurs fois recourbés, si l'aspiration se fait lentement et avec peu de force (1).

Les gélatines nourricières en particulier demandent à être traitées avec beaucoup de prudence, car elles perdent facilement sous l'influence d'une chaleur trop forte ou trop prolongée, leur faculté de gélatinisation.

Si la substance à stériliser ne supporte pas la température d'ébullition sans se décomposer ou perdre complètement sa nature primitive, il faudra recourir à la *stérilisation fractionnée*.

C'est par exemple le cas pour le sérum de sang employé dans l'étude des bactéries à l'état gélatineux. Chauffé à 100° C., il devient liquide en perdant la propriété de se coaguler, et l'on est donc obligé de procéder d'une autre

(1) Par l'opération dite de la *pasteurisation de la bière, du vin, etc.*, on ne veut ordinairement atteindre qu'une stérilisation relative, c'est-à-dire que l'on cherche, en traitant avec précaution le liquide à de hautes températures, à entraver les cellules de levure et d'autres microorganismes de manière que leur pouvoir reproductif et leur action fermentescible soient réduits à très peu de chose. Ce n'est que pour les transports lointains ou si le liquide doit être conservé pendant très longtemps, que l'on cherche à tuer tous les germes vivants. *On ne peut donner de règles générales* pour un traitement de ce genre. La méthode exacte dépend autant de la composition du liquide que des qualités et de l'état de la levure, et il faut, par conséquent, toujours faire des expériences préalables, non seulement sur la hauteur de la température à appliquer, mais aussi sur le temps qui est nécessaire pour qu'elle produise son action.

manière pour l'obtenir stérilisé et à l'état gélatineux. On remarqua qu'une température de 58 à 62° C. suffisait, dans bien des cas, pour tuer les bactéries végétatives qui se développent dans le sérum du sang. Après ce traitement, il n'y a que les spores des bactéries qui restent en vie. En plaçant le sérum gélatinisé pendant quelques jours dans le thermostat, à une température de 30 à 40° C, favorable au développement des spores, une partie de celles-ci germera, et l'on pourra alors tuer les fils végétatifs nouvellement formés par un second chauffage à 60° C. En répétant plusieurs fois cette opération, la masse gélatineuse restera ordinairement stérile pendant un temps illimité, à condition que les germes suspendus dans l'air n'y aient pas accès. Ce procédé, également employé pour la stérilisation du lait, a été inventé par *Tyndall*, et son emploi a été motivé d'une manière plus précise par *Koch*.

Un procédé analogue s'emploie dans les laboratoires destinés à l'étude de la physiologie de la fermentation, pour le traitement des liquides nourriciers qui, par l'ébullition, déposeraient une quantité considérable d'albuminoïdes et qui deviendraient par cela des liquides nourriciers assez médiocres pour la levure alcoolique. Dans ce procédé, la température, tant de stérilisation que de germination des spores, devra varier selon la nature de la substance à stériliser et des germes qu'elle contient, et, comme le résultat est incertain, il faudra toujours observer les matières ayant subi ce traitement assez longtemps, avant de s'en servir, afin de s'assurer si, réellement, elles sont devenues stériles (1).

(1) Dans la pratique, on cherche aussi à obtenir une stérilisation avec l'aide d'appareils clos pour le refroidissement et l'aération du mout de brasserie que l'on veut amener stérile dans les cuves de fermentation. Il est vrai qu'il est impossible que le mout se conserve dépourvu de tout germe étranger à

c. — *Stérilisation de l'air.*

La stérilisation de l'air se fait le plus aisément, comme cela a déjà été indiqué, au moyen de filtres de coton ; les bains d'acide sulfurique, d'eau salée, les filtres de toile, etc., sont moins efficaces. Dans les laboratoires où il s'agit souvent d'exécuter des travaux dans de l'air privé de tout germe, on se sert d'une caisse en verre dont une paroi peut être soulevée suffisamment pour permettre d'y introduire les bras. Avant de se servir de cette caisse, on en lave tout l'intérieur et on la ferme. Les particules et les germes qui voltigent dans l'air, tomberont dans le fond humide où ils resteront retenus.

4. — Désinfection

Une autre méthode pour tuer les germes gênants, consiste à employer des *désinfectants* qui agissent comme toxiques sur les organismes. Grand nombre de ces subs-

la fermentation dans des cuves découvertes ; mais, *en comprenant bien la chose, on peut y contribuer pour beaucoup.* Le praticien intelligent aura toujours soin que l'air de la cave de fermentation soit aussi pur que possible, que les cuves soient propres, de même que tous les appareils que l'on plonge dans le liquide en fermentation — tels que thermomètres, petits verres, etc., — *enfin que tout soit d'une propreté irréprochable. Il va sans dire que toutes ces mesures de précaution n'ont obtenu une valeur réelle dans l'application qu'après que, par la réforme de Hansen, la levure garantie pure eut été introduite dans la cave de fermentation.*

tances trouvèrent leur application dans la pratique. La limite pour l'emploi de pareilles substances toxiques doit être déterminée dans chaque cas particulier. La manipulation de ces poisons pouvant être préjudiciable à celui qui opère, il s'agit de déterminer jusqu'à quel degré il est permis de les diluer, pour qu'ils agissent encore efficacement.

Des recherches sur l'action des toxiques sur les microorganismes ont démontré que la force de résistance des cultures d'une seule et même espèce peut être très différente, non seulement pour les spores, mais aussi pour les formes végétatives. La nouvelle et l'ancienne culture se comportent différemment et c'est aussi le cas pour les individus d'une même culture. Il est une règle pour les expériences de ce genre, que les organismes qui ont été traités par un désinfectant doivent ensuite être placés dans les meilleures conditions de vie possibles, sans quoi ils n'arrivent pas à se développer, même s'ils sont vivants et capables de se reproduire. En général, on ne devra pas se contenter de la température ordinaire ambiante et du milieu nourricier solide. Il faut aussi consacrer un certain temps à l'examen de telles végétations avant d'affirmer définitivement qu'elles soient tuées, car elles ne sont souvent qu'arrêtées et reprennent vie après quelque temps pour se développer avec toute la vigueur. Lorsqu'on emploie un désinfectant, il y a encore la matière dans laquelle se trouvent les organismes, ainsi que la température, qui peuvent avoir de l'importance. Avant d'examiner une culture traitée de la sorte, il faut avoir excessivement soin de la débarrasser, par lavage et par dilution, des dernières traces du désinfectant.

En 1839, *Schwann* fit déjà observer que les cellules de levure étaient tuées par certains produits chimiques, et qu'en même temps la fermentation s'arrêtait. Ainsi fut posée la base de la théorie des antiseptiques.

C'est à *Koch* que nous devons les premières communications détaillées sur ce sujet. Plus tard, *Gruber* et d'autres chercheurs continuèrent ces expériences.

Koch étudia différents toxiques tant au point de vue de la concentration nécessaire pour tuer les bactéries et leurs spores, qu'à celui de la quantité nécessaire pour ne faire qu'enrayer le développement des microorganismes dans les liquides nourriciers convenables.

Nous donnons ici brièvement les résultats des expériences en question de *Koch* : l'acide phénique ne fit pas preuve d'un pouvoir désinfectant aussi grand que l'on croyait. Une solution à 5 0/0 ne détruisit qu'au bout de 48 heures la faculté de se développer chez les spores de l'anthrax, tandis que les bacilles eux-mêmes furent tués en deux minutes, par l'action d'une solution à 1 0/0. Pour enrayer la croissance de ces derniers, une solution de 1/850 suffit, une humectation des spores du bacille de l'anthrax répétée 5 à 7 fois avec une solution au 5 0/0 fut capable d'en retarder le développement. En solution huileuse ou alcoolique au 5 0/0 l'acide phénique fut absolument sans effets sur les cellules et les spores de l'anthrax. Sous forme de vapeurs, l'acide phénique agit plus énergiquement ; cependant les vapeurs d'acide phénique à 75° C. ne purent pas détruire, dans l'espace de deux heures, la faculté de développement des spores mentionnées. L'acide sulfureux, même dans les conditions les plus favorables, n'est pas capable de détruire tous les germes. Par contre, le chlore, le brome et le sublimé corrosif sont des désinfectants très sûrs. Le sublimé corrosif a, d'après *Koch*, dans la proportion de 1/1000 une action destructive sur tous les germes. Toutefois, d'après les expériences de *Johan-Olsen*, les moisissures ne sont détruites que par des solutions plus concentrées, par exemple au 1/400 pour le *Penicillium glaucum*. Il y a aussi plusieurs bactéries (les bacilles de la fièvre puerpérale, des

abcès, de la putréfaction) qui germent et croissent, quoique d'une façon plus lente que normalement, sur des tranches de pommes de terre imprégnées d'une solution de sublimé au 1/300 et ce n'est qu'une solution au 1/300 qui en arrête le développement dans ces conditions. Gruber trouva, par ses expériences les plus récentes, exécutées avec toutes les précautions imaginables, que par exemple les spores de l'anthrax n'étaient tuées rapidement que par du sublimé au 3/1000, par du sublimé-chlorhydrique au 1/1000, par du sublimé-tartrique au 1/1000.

Un désinfectant dont l'utilité pratique a généralement été reconnue, est le *lait de chaux* qui est très efficace quand il est frais.

Pour le nettoyage des tuyaux, des baes, etc., où se trouvent souvent des dépôts considérables de matières organiques qui se décomposent facilement par l'action des microorganismes, les *solutions de soude* sont particulièrement recommandables; elles ont une action dissolvante et désagrégeante sur les résines et sur les matières albumineuses, qui peuvent alors être facilement enlevées par de l'eau. Le nettoyage des conduites et des tuyaux doit être fait chaque jour à la vapeur. D'après les expériences d'Aubry et de Will, le *chlorure de chaux*, même fortement dilué (2 à 3 0/0 de chlore), a été reconnu comme un excellent désinfectant à cause de son action destructive sur les microorganismes. Le prix modique de cette substance permet surtout de l'employer pour le nettoyage des murs, des pavés, des égouts, etc. Le *bisulfite de chaux* agit aussi très énergiquement; celui du commerce contient ordinairement 7 0/0 d'acide sulfureux. On l'emploie étendu de son double ou triple volume d'eau. Ce produit est surtout recommandable pour le nettoyage des cuves et des tonneaux.

Les sacs à trouble, employés dans les brasseries, et dont

le tissu contient souvent, d'après les recherches de M. Will, de forts dépôts de *lectures sauvages et de bactéries*, par suite d'un mauvais nettoyage, doivent être désinfectés par une solution de *chlorure de chaux*. M. Will recommande, basé sur ses expériences pratiques, une solution contenant 1 0/0 de chlore actif, qui correspond à peu près à 3-3 1/2 kilos de bon chlorure de chaux du commerce, sur 1 hectolitre d'eau. On agite plusieurs jours ce mélange et après avoir laissé déposer, on verse pour l'utiliser, le liquide clair qui contient le chlore. Ensuite on lave les sacs à l'eau pure. Dans les laboratoires physiologiques, où il s'agit tout particulièrement de se garantir contre l'invasion des germes étrangers, une solution alcoolique d'*acide salicylique* sera d'un emploi efficace (Dans le laboratoire de Carlsberg, Hansen l'emploie souvent pour le nettoyage des tables). Les propriétés enrayantes de l'acide salicylique sur la fermentation sont généralement connues (1). Pour des cuves particulièrement malpropres, on

(1) Parmi les nouvelles substances employées dans ce but, la *formaldehyde* tient un rang élevé. Dans le commerce, elle est connue sous le nom de *formaline* en solution à 40 0/0. Son action sur les bactéries est tout aussi énergique que celle du sublimé corrosif, tout en étant moins dangereuse pour l'homme et les animaux supérieurs. On l'utilise comme désinfectant, soit en humectant avec de cette solution du coton ou de l'étoffe que l'on suspend dans les locaux qui doivent être purifiés, soit en se servant de lampes spéciales qui, par la combustion d'alcool méthylique, développent de la formaldehyde. On emploie également la formaline en solutions de 1 à 2 p. 0/0 au nettoyage des ustensiles. Suivant Windisch, les cellules de levure sont moins sensibles que les bactéries, à l'action de la formaldehyde.

Dans ces derniers temps, on a aussi obtenu de très bons résultats par l'emploi de *l'antinonine*, un composé de crésol mélangé avec du savon et d'autres substances. Des expériences d'Aubry ont démontré que c'est un moyen sûr contre le mэрule (champignon des maisons) et que dans l'industrie elle pouvait très bien être utilisée pour le badigeonnage des murs et us-

recommande un léger badigeonnage avec une solution alcoolique d'acide salicylique; quelque temps après, on les lave à l'eau de soude, puis on les rince à l'eau pure. On a aussi employé l'acide fluorhydrique comme substance désinfectante (voir page 33).

tensiles qui ne sont pas en contact avec le liquide à fermenter.

On a fait, depuis plusieurs années, dans les distilleries et les fabriques de levures sèches, des séries d'expériences sur l'influence que peuvent avoir certains antiseptiques sur les cellules de levures, leur force fermentative, la quantité d'alcool provenant de la fermentation et enfin sur la reproduction des cellules.

Hayduck a trouvé, en 1881, que de très petites doses d'acides (acide sulfurique, acide lactique) favorisent non seulement la fermentation, mais encore le développement des cellules.

En 1882, Heinzelman découvrit que des traces d'acide salicylique augmentent la force fermentative en ce sens que, sous l'influence de cet acide, la levure produit dans le même temps, une quantité d'alcool plus grande que celle résultant de la fermentation de la même levure sans l'action du même acide.

Plus tard, Biernaki, en 1887, et Schulze, en 1888, ont démontré que tous les antiseptiques, dans des conditions particulières, et surtout employés en faibles doses, possèdent la propriété d'accélérer la fermentation et de l'augmenter.

Les recherches d'Effront faites dans le même but, montrent qu'il est possible, par l'emploi de petites quantités d'acide fluorhydrique, de stimuler les cellules de levures.

Une addition de 0.3 grammes d'acide fluorhydrique à 100 centimètres cubes arrêterait complètement la multiplication des cellules de levure, mais par contre pas leur pouvoir ferment. En commençant par de très petites doses que l'on augmente peu à peu, on peut arriver, suivant la race de levure que l'on a en traitement, à accoutumer celle-ci à supporter d'assez grandes quantités de ce poison. On commence à faire fermenter 100 c. c. de moût avec 20 milligrammes d'acide fluorhydrique, auxquels on ajoute de nouveau 10 milligr., dès que le quart du sucre est fermenté. Quand la moitié du sucre est fermentée, on mélange 100 c. c. du liquide en fermentation avec 900 c. c. de moût renfermant 40 milligrammes d'acide fluorhydrique sur

5. — Ballons, Flacons et Récipients.

(Systèmes PASTEUR, CHAMBERLAND, FREUDENREICH, HANSEN,
et DE CARLSBERG, etc.).

La première condition exigée des vases servant à l'élevage des cultures, est qu'ils soient construits de manière à ce que toute infection du dehors soit rendue impossible. Les ballons Pasteur remplissent toutes les conditions exigées d'une façon irréprochable (1). La figure 3 montre un de ces petits ballons dont la forme perfection-

100 c. c. On continue ainsi jusqu'à ce que la dernière levure fermente en présence de 300 milligrammes d'acide fluorhydrique sur 100 c. c. de moût. Dans un moût acidulé par du fluorure d'ammonium le pouvoir ferment continue avec la même énergie. La condition essentielle pour qu'un pareil traitement de la levure donne aussi dans la pratique les résultats indiqués, est de trouver la race de levure convenable par un choix méthodique, suivant le principe de Hansen.

Enfin, les expériences de Hirschfeld s'enchaînent avec les précédentes. De ses observations, il résulte qu'une addition de 0.01 à 0.02 0/0 d'acide chlorhydrique peut accélérer la fermentation acétique. Les observations de Lafar sur l'influence de l'acide acétique sur les levures de vin, nous donnent aussi des exemples de phénomènes analogues.

Tous ces changements dans la nature des cellules de levure ou des bactéries ne sont que passagers.

(1) Chevreul et Hoffmann avaient, il est vrai, déjà trouvé que si l'on se servait pour la stérilisation des liquides, de vases munis de tubes ouverts mais recourbés, les liquides se conservaient toujours stériles. Quoique ce soit Chevreul qui, le premier, donna l'idée de ces ballons, pour des raisons pratiques, nous n'en changerons pas le nom; c'est d'ailleurs bien à Pasteur que l'on en doit l'emploi fréquent qui en est fait partout aujourd'hui.

née est celle qui est employée dans le laboratoire physiologique de Carlsberg, dirigé par *Hansen* et dans le laboratoire de l'auteur. Pendant l'ébullition du moût houblonné (que l'on prendra de préférence des sacs à trouble), les vapeurs sortent par la tubulure droite, plus large, à laquelle est adapté un tube en caoutchouc; quand ce dernier est fermé (après avoir maintenu l'ébullition pendant environ un quart d'heure) les vapeurs n'ont d'autre issue que par le tube recourbé. Au bout de dix minutes environ, on retire le ballon du bain de sable, et l'on peut boucher le tube recourbé avec un bouchon d'amiante. Alors le contenu du ballon pourra rester intact pendant des années. Pendant le refroidissement ou pendant l'aspiration qui s'ensuit, l'air est filtré en partie

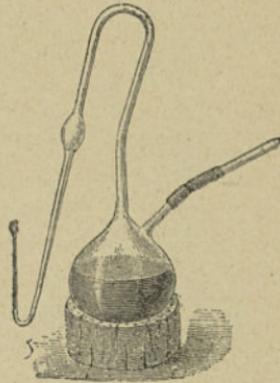


FIG. 3.

Ballon Pasteur.

par le bouchon d'amiante; mais on peut tout aussi bien refroidir sans boucher le tube; les germes qui pourraient être entraînés se déposent à la partie inférieure du coude ou atteignent tout au plus l'élargissement du tube étroit, de sorte qu'ils n'entrent pas en contact avec le liquide. Si l'on est obligé d'agiter fortement le liquide dans le ballon ou de le faire sortir par le tube droit, tout en voulant le préserver de toute infection, la partie inférieure du tube devra être chauffée à la flamme. Si le ballon doit être débouché pour être mis en communication avec un autre, il faudra soit opérer dans un petit espace exempt de germes, soit procéder au débouchage et à la mise en communication dans une flamme. On place un bec Bunsen devant soi, le ballon que l'on veut vider à

sa gauche, et celui destiné à recevoir le liquide ou la culture à sa droite. Cela fait, on ouvre le tube du ballon de gauche dans la flamme, en y retirant rapidement le serpentin avec son bouchon de verre. Pendant que le tube ouvert se trouve dans la flamme, on retire vite le bouchon de verre du ballon de droite, et le tube chauffé du premier ballon est adapté à la tubulure du



FIG. 4

Flacon Chamberland.

Le ballon Pasteur sera, dans certains cas, indispensable, par exemple pour les études physiologiques, où l'on travaille avec des quantités de liquide plus considérables.

Dans les dernières années, on fit usage d'autres ballons et vases, principalement des flacons Chamberland (Fig. 4), dont le col est muni d'un bouchon rodé à l'émeri et se terminant à la partie supérieure par un tube court et ouvert, rempli de coton stérilisé bien tassé.

Le flacon de Freudenreich est construit d'après le même principe, sauf que le corps en est cylindrique.

Dans des cas spéciaux, on emploie le flacon de Hansen (fig. 5). Le bouchon rodé à l'émeri et en forme de capuchon, est muni d'un filtre de ouate (a), et il se trouve au flacon un petit tube latéral bouché avec un tampon d'a-

miante (d). On emploie ce flacon pour la conservation des cultures pures, ainsi que pour l'expédition de petites cultures ou d'échantillons pris dans l'appareil propagateur (1). Dans le premier but, on remplit le flacon à moitié d'une solution de saccharose à 10 0/0, dans laquelle on sème une parcelle de la levure en question. Le tampon d'amiante et le bord inférieur du bouchon se recouvrent d'un enduit de cire à cacheter (c). Pour les autres usages nommés en dernier lieu, on remplit le fond du flacon d'une couche de coton (e) et l'on en place aussi un tampon à l'intérieur du bouchon, au-dessous du filtre. Pour le mode d'emploi, voir le chapitre VI.



FIG. 5.

Flacon de Hansen



FIG. 6.

Une modification de ce flacon (Fig. 6) introduite par l'auteur du présent ouvrage, consiste en ce que dans le capuchon un petit tube recourbé ait été introduit comme prolongement immédiat du filtre de ouate. Ceci a permis d'empêcher, pendant plusieurs années, l'évaporation du contenu du flacon, quand le bord inférieur du capuchon et le tube latéral sont hermétiquement fermés. On peut également se servir de ce flacon pour la conservation des gélatines quand on veut éviter qu'elles ne se durcissent à la surface.

(1) Ces appareils seront décrits au chapitre VI.

Pour l'élevage de très grandes cultures, on se sert des

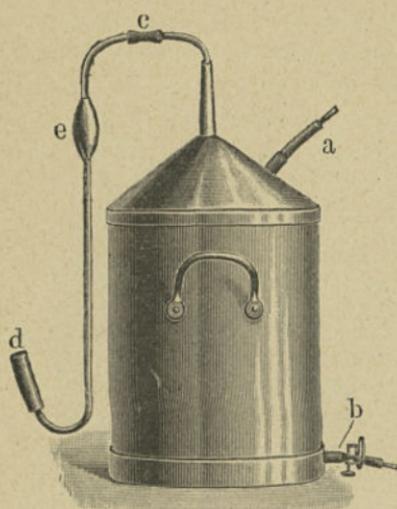


FIG. 7.

Récipient de *Carlsberg*
Ancien modèle.

réipients de Carlsberg (Fig. 7 et 8). Ils contiennent 10 litres, sont en cuivre étamé, cylindriques et coniques par le haut. Au sommet du cône est vissé ou soudé un tube deux fois recourbé (c d.) muni d'un renflement (e). Sur une arête du cône se trouve le tube d'infection avec son bouchon de verre (a) et au bas du cylindre le tube (b) pour l'extraction du liquide fermenté et de la levure. Ce tube est muni

d'une pince à vis. Après la stérilisation du liquide, on bouche le tube recourbé avec un filtre d'amianté ou de ouate (d) qui est adapté solidement. Le nouveau modèle (Fig. 8) a le tube recourbé rodé dans l'orifice qui se trouve à sa partie supérieure où il est maintenu par une vis, de manière à ce que toute la partie supérieure puisse être dévissée pour le nettoyage du récipient. Le filtre est également vissé à la pointe du tube recourbé. On trouvera des détails plus amples sur l'emploi de ces récipients dans l'ouvrage de Hansen: *Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie* » (chez Oldenbourg, Munich).

6. — Milieux nourriciers

En ce qui concerne les *milieux nourriciers*, il s'agit naturellement toujours de trouver ceux qui conviennent le mieux aux organismes que l'on veut cultiver. Si en même temps, ils possèdent l'avantage d'être par eux-mêmes peu

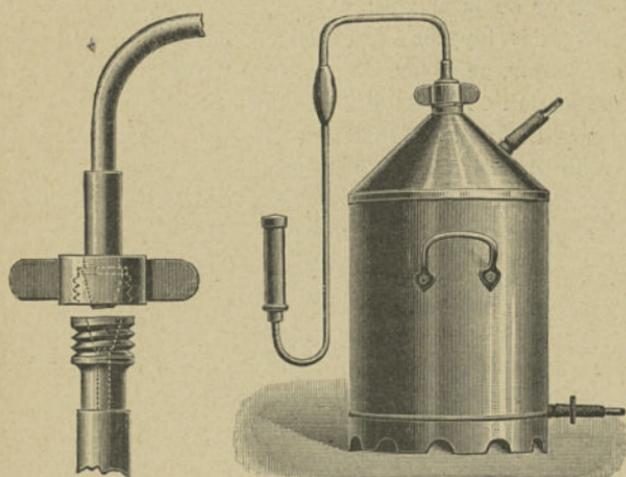


FIG. 8.

Récipient de *Carlsberg*.
Nouveau modèle.

b. Raccord entre le récipient et le tube recourbé.

favorables au développement des espèces concurrentes, on aura beaucoup gagné. Dans la règle, si l'on fait des expériences comparatives, le liquide nourricier devra toujours rester le même. Pour l'étude des ferments alcooliques, Hansen emploie le plus souvent le moût houblonné

des sacs à trouble ; dans des cas spéciaux, de l'eau de levure additionnée aussi de glucose ou d'une solution aqueuse de saccharose ou d'autres solutions sucrées, s'emploie pour les recherches de ce genre. Si l'on veut employer un milieu nourricier solide, on peut mêler au liquide 3 à 10 pour cent de gélatine. Pour les études bactériologiques, on emploie des liquides analogues ou plus souvent encore de l'extrait de viande additionné de peptone ; on neutralise ce mélange par exemple avec du bicarbonate de soude. Comme moyens de solidification, on emploie ou de la gélatine ou pour des cultures qui doivent être développées à des températures au-dessus de 30° C., de l'*agar*, gelée formée par des algues marines, dans la proportion de 1 à 2 0/0. Pour des cultures de bactéries thermophiles, entre 60° et 70° C., *Miquel* opère avec une addition de 2 1/2 à 3 0/0 de *Carraghen* ou *mousse d'Islande* au liquide nourricier. Très souvent on utilise, comme milieux solides, des tranches de *pommes de terre*. Pour les cultures sur plaques des bactéries acidifiantes, on ajoute du *tournesol* ou plutôt encore du *carbonate de chaux*, de la craie réduite en poudre et lavée, ce qui différencie les colonies de ces bactéries de celles d'autres espèces, par la zone claire et transparente dont elles paraissent être entourées. Pour certaines bactéries (nitifiantes), on prend comme milieu nourricier de la gelée de *l'acide silicique*. Pour l'étude des moisissures, les milieux nourriciers solides sont les meilleurs ; dans la plupart des cas, on emploiera de préférence le pain noir stérilisé. Si l'on veut employer des liquides, ceux qui conviendront le mieux seront le moût de bière, des décoctions de fruits ou des solutions sucrées additionnées d'acide tartrique ou de tartrates. *Pasteur* employa exclusivement des liquides comme milieux nutritifs dans les recherches qu'il fit sur les organismes de la fermentation. Plus tard, les milieux solides furent beaucoup employés

et sous ce rapport *Koch* nous a principalement donné de nombreux avis pratiques.

Nous venons d'exposer brièvement comment nos microorganismes se cultivent et comment on les protège contre les infections provenant soit du liquide lui-même, soit des récipients et ustensiles, de l'air ou de l'expérimentateur. La première et en même temps la plus importante question qui se pose maintenant est-celle-ci : *comment obtient-on la culture absolument pure qui doit être introduite dans le ballon ?* Pour des motifs purement historiques, il a été indiqué en premier lieu *les conditions pour la conservation de la culture pure*, car on les connaissait longtemps avant d'être arrivé à préparer sûrement la culture pure elle-même.

Il sera très instructif de voir comment on a, petit à petit, fait des progrès, et nous traiterons de nouveau le sujet au point de vue historique, à partir du moment où des efforts vraiment rationnels ont été faits pour atteindre ce but.

7. — Préparation de la culture pure.

Une culture véritablement pure ne peut être obtenue avec certitude que par l'ensemencement d'une seule cellule. Une telle culture est la condition indispensable pour des recherches exactes sur les microorganismes. Comme cela a été signalé plus haut, ces recherches peuvent avoir des buts différents : celui de suivre l'individu, la cellule isolée dans les phases de son développement, c'est l'étude morphologique ou bien celui d'étudier les conditions vitales des végétations qui sont nées de la cellule isolée, c'est l'étude biologique et physiologique. De même que ces

deux méthodes d'analyses sont très distinctes, de même les manières de procéder devront être complètement différentes.

a. — *Cultures pures pour les études du développement et pour les recherches morphologiques.*

De même que l'on trouva antérieurement, par l'examen de la levure au microscope, que celle-ci se composait de cellules, de même aussi l'on chercha bientôt, par l'examen d'une seule de ces cellules, à déterminer comment elle se multipliait et sous quelles formes apparaissaient les nouvelles générations. On faisait donc un examen morphologique d'une culture pure. Il fallait alors s'arranger de manière à ce que l'observation ne fut pas dérangée par d'autres cellules, pouvant entraver la cellule choisie dans sa reproduction, ou la cacher aux yeux de l'observateur. Il ne fut d'ailleurs attaché aucune importance à des cellules étrangères qui auraient pu se présenter dans d'autres parties de la préparation, ou en général dans toute la préparation.

Ehrenberg a déjà observé, en 1821, par des investigations de ce genre, la germination de quelques spores de champignons. Plus tard *Mitscherlich*, *Kützing* (1851) et *F. Schulze* (1860) ont observé de la même manière la multiplication des cellules de levure. On diluait une petite quantité de levure haute avec du moût de bière jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus qu'une ou deux cellules de levure ; avec une de ces gouttes, on faisait une préparation ordinaire que l'on scellait et que l'on regardait directement au microscope pour étudier le développement de la cellule. Plus tard *Tulasne* (1861) et surtout *de Bary* (1866), employèrent principalement le même procédé dans leurs célèbres recherches sur la germination des spores

des champignons. *Brefeld* alla plus loin dans ses recherches et suivit le développement du mycélium formé par la spore jusqu'à ce que celui-ci eut de nouveau produit des spores. Il semait les spores sur le porte-objet. Si la durée de l'examen devait dépasser le temps qui suffisait à l'évaporation d'une goutte de liquide de dimension ordinaire, il ajoutait de la gélatine au liquide; au-dessus de l'appareil, on plaçait un petit écran en papier que l'on fixait au microscope pour tenir à l'écart, autant que possible, les germes étrangers. Quand le développement se faisait dans des gouttes ordinaires de liquide, on plaçait la préparation pendant l'intervalle entre les observations, sous une cloche humide de verre. Il ne fut donc pas procédé à un examen ininterrompu, ce qui n'eut pas même été possible pour les champignons de plus grande espèce. D'après toute la disposition de l'expérience, il ne peut donc être ici question de cultures absolument pures; mais comme cela a été dit plus haut, une pareille recherche pourra bien être exécutée avec de la matière impure.

b. — *Cultures pures pour expériences biologiques et physiologiques sur des cultures en masse.*

Si, par contre, le but de la culture pure est de servir à des études *biologiques* ou *physiologiques*, de telle sorte qu'une *culture en masse* de la végétation soit nécessaire, un examen direct sur la table du microscope sera impossible et les procédés décrits plus haut ne pourront, par conséquent pas être employés. Les méthodes que l'on applique dans ce but, peuvent être résumées en deux groupes, savoir : les *méthodes physiologiques* et les *méthodes de dilution*. Pour les premières, on emploie des liquides, pour les secondes comme matières diluantes, des liquides ou des gélatines.

a. — Méthodes physiologiques.

Les méthodes physiologiques qui furent employées par *Pasteur*, *Cohn* et d'autres, émanant de l'idée que les espèces se trouvant dans un mélange, se multiplieront inégalement, en raison de leurs natures différentes, si toutes sont cultivées dans le même liquide nourricier, sous l'action de températures égales, et cela de telle façon que les espèces qui trouvent des conditions de nutrition défavorables seront peu à peu éliminées par l'espèce ou les espèces qui se trouvent dans des conditions de nutrition particulièrement favorables. Pendant la durée de ces recherches, on a employé des liquides très différents pour ces cultures, par exemple des liquides alcalins pour les végétations de bactéries ; des liquides nourriciers acides pour enlever aux végétations de levure leurs bactéries (de l'acide lactique, de l'acide tartrique, de l'acide fluorhydrique, etc.). Le point faible de toutes les méthodes de ce genre est que l'on est toujours obligé de prendre comme point de départ, des éléments inconnus, c'est-à-dire le mélange impur. Il est donc impossible de savoir quels résultats un tel traitement amènera ; car il est dans la nature des choses que l'on agira toujours au hasard, et à vrai dire, il ne peut donc être ici question d'aucune méthode. Il subsiste toujours la possibilité que les espèces faibles ne soient qu'entravées et réprimées, et non détruites ; lorsque les espèces plus vigoureuses, après avoir atteint le point culminant de leur développement, entrent dans un état de faiblesse, il y aura par conséquent chance pour que d'autres espèces commencent à se multiplier. Il y aura de plus encore toujours la possibilité, que non seulement une, mais deux ou plusieurs espèces croissent avec la même facilité dans le liquide nour-

ricier, et qu'elles se développent par conséquent avec une vigueur égale. Ceci arrivait par exemple avec l'ancienne levure de brasserie impure. En étudiant cette dernière, on pouvait très souvent, à l'aide de la méthode de *Hansen*, éliminer de la même masse de levure plusieurs espèces différentes et typiques de levure dite de culture. Un exemple frappant qui fait voir les dangers que le traitement physiologique peut introduire, nous est fourni par le procédé que *Pasteur* indiqua pour la purification d'une levure de brasserie. La levure impure est introduite dans une solution de sucre de canne à laquelle on a ajouté une petite quantité d'acide tartrique. Le but que l'on se propose dans ce cas, est de délivrer la masse de levure des germes de maladies qui s'y trouvent mêlés. Les recherches entreprises par *Hansen* ont démontré que si, de cette manière, on arrive ordinairement à arrêter ou à réprimer les bactéries qui se trouvent dans la masse de levure, les espèces de levure appelées levures sauvages, parmi lesquelles se trouvent aussi les levures de maladie, se développeront avec toute vigueur, et réprimeront même, dans bien des cas, complètement la levure de culture, c'est-à-dire la levure même que l'on désirait purifier. Les espèces des levures sauvages, les levures de maladie, n'existeraient-elles même au début qu'en quantité minime, pourront arriver, par le traitement *Pasteur*, à constituer la partie prédominante de la masse entière. Le traitement d'éléments inconnus choisis sans méthode, a par conséquent mené au résultat opposé à celui que l'on se proposait d'atteindre. Même quand la masse de levure dont il s'agit ne se compose que de variétés de levures sauvages, il est impossible, par le procédé indiqué de *Pasteur*, de préparer avec certitude une culture pure d'une espèce déterminée du mélange.

Un emploi de l'acide fluorhydrique ou de ses composés, par exemple le fluorure d'ammonium pour la purification

d'un levain impur — levure de brasserie ou de distillerie — comme le propose *Effront*, entraîne avec lui les mêmes dangers que l'emploi de l'acide tartrique mentionné plus haut. Des expériences méthodiques faites par *Holm*, et l'auteur, ont démontré que, par le traitement d'un levain impur, d'après la formule d'*Effront*, le développement des levures sauvages et des mycodermes peut être plus considérable que celui des levures de culture : on peut voir du même coup, qu'une espèce aussi dangereuse que le *Bacterium aceti* résiste dans beaucoup de cas, à l'action du traitement ; elle se multiplie même souvent plus énergiquement que dans les conditions normales, lorsqu'on emploie l'acide fluorhydrique ou l'un de ses sels.

Si maintenant nous demandons si l'on doit, en général, conseiller l'emploi d'un des procédés mentionnés pour purifier une levure inconnue et impure, la réponse sera, pour les raisons que nous venons d'indiquer, négative. Ceci est exact, peu importe que la culture serve à des usages scientifiques ou industriels, car dans les cultures ultérieures, le danger ne sera jamais écarté de voir des espèces, toutes différentes de celle que l'on voulait obtenir, prendre le dessus. Si le point de départ est incertain, le résultat le sera tout autant, et des méthodes de ce genre doivent être considérées aujourd'hui comme surannées et complètement manquées. Elles peuvent peut-être, dans des cas isolés, servir à préparer le développement d'une vraie culture pure. Dans les différentes branches de l'industrie de la fermentation, il n'y aura cependant qu'un seul chemin qui mène au but, c'est celui d'employer les principes suivis, depuis des années déjà, dans l'agriculture et l'horticulture, et qui consiste à choisir, après des essais conformes à un plan méthodique, l'espèce particulière qui offre, dans les conditions données, les meilleurs résultats, pour ne se servir que de celle-ci pour l'ensemencement. Mais ceci n'est possible

qu'en suivant la méthode de *Hansen*, sur laquelle nous donnerons des détails plus tard.

b. — Méthodes de dilution.

Les autres méthodes employées dans les études physiologiques sont les *méthodes de dilution* ou ce qu'on appelle les *cultures fractionnées*, et qui sont basées sur le principe qui consiste à diluer les éléments donnés, de telle façon que l'on arrive à la fin à n'avoir plus qu'une seule cellule. Dans la plupart de ces cultures, on ne calcule qu'avec des probabilités. Pour les ferments alcooliques, *Hansen* a, par contre, transformé ce procédé en une *méthode exacte*.

Lister (1878) est le premier qui a employé des méthodes de ce genre. Pour développer des cultures pures de bactéries d'acide lactique, il détermina, au moyen du microscope, le nombre de bactéries prises dans une très petite goutte de lait caillé, en les comptant dans plusieurs champs de la préparation, pour calculer ensuite leur nombre dans toute la préparation. Ensuite il calculait la quantité d'eau stérilisée nécessaire pour étendre la goutte, afin de pouvoir compter en moyenne moins d'une bactérie par gouttelette. Moyennant cinq de ces gouttelettes, il infecta cinq flacons contenant du lait bouilli. Le résultat fut, que le lait se cailla dans un de ceux-ci qui contenait le *Bactérium lactis*, tandis que les quatre autres flacons restèrent intacts et ne montrèrent aucune trace de bactéries, *Nægeli* et *Fitz* ont, plus tard, employé le même procédé.

Pour des dilutions de ce genre, on a aussi employé l'air (*Pasteur*) : une petite portion de levure est desséchée et réduite en fine poussière avec du plâtre. On laisse tomber d'une assez grande hauteur un nuage de cette pous-

sière et, pendant la chute des particules, on ouvre plusieurs ballons dans lesquels on avait préalablement fait le vide. Il pourra, de la sorte, arriver que des cellules de levure, disséminées dans le nuage, pénètrent isolément dans quelques-uns de ces ballons.

Comparée aux méthodes physiologiques, celle par dilution qui vient d'être décrite, marque un progrès visible ; on s'est approché, à cet égard, sensiblement du but. Mais il est évident que, même si la dilution était assez forte, comme dans l'exemple précédent, où de plusieurs ballons un seul montra un développement, il n'est nullement prouvé que ce ballon isolé n'ait reçu *qu'un seul* germe. L'incertitude est donc encore très grande, même dans le cas où l'on peut procéder au dénombrement des individus avec lesquels on opère. Il sera, de plus, en ce qui concerne les bactéries, très difficile et souvent même complètement impossible, de les compter. L'exactitude de ces calculs reste en tout cas très problématique. La question qui se pose sera donc toujours celle-ci : comment distinguera-t-on les ballons qui n'ont reçu *qu'une seule* cellule, de ceux qui, malgré les prévisions du calcul, ont été infectés de *plusieurs* cellules ? En ce qui concerne les bactéries on n'a, jusqu'à ce jour, trouvé aucun moyen d'y répondre.

Pour la levure, la question fut résolue par Hansen, qui perfectionna le procédé de telle manière qu'il le transforma en une *méthode exacte* (1881). Il se servit d'une dilution avec de l'eau, de la manière suivante : on dilue la levure développée dans le ballon, dans une proportion quelconque avec de l'eau stérilisée, et on compte le nombre de cellules contenues dans une gouttelette du liquide que l'on a vivement secoué. Dans ce cas, la détermination du nombre se fait en portant la goutte sur un couvre-objet au milieu duquel sont gravés quelques petits carrés pouvant servir de points de repère à l'œil : le

couvre-objet se pose sur la chambre humide (fig. 2). La goutte ne doit pas dépasser la limite des carrés. Cela fait, on procède au dénombrement des cellules contenues dans la goutte. Supposons par exemple qu'elle contienne 10 cellules; on porte alors une goutte d'égale grosseur du liquide, que l'on vient de nouveau de secouer fortement, dans un ballon contenant un volume déterminé, par exemple 20 cm³ d'eau stérilisée. Il y aura alors une certaine probabilité pour que ce petit ballon contienne à peu près 10 cellules. Si, après avoir secoué fortement, et pendant longtemps le contenu, jusqu'à ce que les cellules soient également réparties dans l'eau, l'on en introduit maintenant 1 cm³ dans chacun des ballons d'une série de 20 renfermant le liquide nourricier, d'après le calcul, la moitié de ces 20 ballons auront reçu chacun *une* cellule. Mais le tout ne repose jusqu'à présent, comme dans le procédé de *Lister*, que sur une probabilité. Si on laisse les ballons en repos pour que le développement continue, on pourra espérer d'obtenir une culture pure dans quelques-uns d'entre eux. Cependant, on ne peut se baser sûrement sur cela et continuer ainsi les recherches. Mais *Hansen* réussit à ajouter un point qui, seul, donne de la certitude à cette expérience. Si l'on secoue très fortement les ballons infectés pour les laisser ensuite reposer tranquillement, les cellules isolées descendront au fond et resteront collées aux parois du ballon.

Il est évident que si un ballon contient par exemple trois cellules, celles-ci seront, après que le liquide aura été secoué, toujours ou du moins dans la plupart des cas, éloignées l'une de l'autre, de sorte que chacune se déposera isolément au fond. Au bout de quelques jours on remarquera, en soulevant le ballon avec précaution, qu'une ou plusieurs *taches blanches* se seront formées *au fond du ballon*. *S'il ne se trouve qu'une seule tache, on aura obtenu la culture pure.*

Il est évident qu'au moyen de ce procédé, on est à même d'introduire *directement* une cellule unique dans le ballon contenant le liquide nourricier ; ou bien on porte une gouttelette contenant la cellule unique dans une chambre humide où on la laisse se développer, pour ensemer ensuite dans le ballon, la végétation formée.

C'est ainsi (par observation des taches dans les flacons) que Hansen prépara toutes les premières cultures pures avec lesquelles il fit ses expériences fondamentales sur les ferments alcooliques.

Pour préparer les cultures employées dans les études physiologiques, on a aussi utilisé des *substances nutritives solides*. L'idée de cette méthode a été donnée par *Schroedter* (1872) qui, dans ses recherches sur les bactéries à pigment, employa entre autres des *tranches de pommes de terre* comme milieu nourricier. Il avait observé, que lorsque de ces tranches avaient été exposées à l'air pendant quelque temps, il se produisait à leur surface des taches et des gouttes de différentes formes et couleurs. Chacune de ces taches contenait le plus souvent *une* espèce déterminée de microorganismes.

Koch a essentiellement développé et perfectionné cette méthode. Il préparait d'abord les cultures pures par *inoculation en stries dans la gélatine nutritive*. Plus tard, il a élaboré une méthode bien meilleure, celle de la *culture sur plaques* (1883). Le procédé est le suivant : on prend une parcelle de la culture impure que l'on délaie dans une grande quantité d'eau stérilisée. Puis on introduit de nouveau un peu de ce liquide dans un ballon qui contient par exemple un mélange de bouillon et de gélatine chauffée à 30° C. On agite le ballon pour répartir les germes et on en répand le contenu sur une grande plaque de verre, que l'on recouvre ensuite d'une cloche. Peu après, la gélatine se fige et les germes se trouvent alors pris dans la masse solide. Au bout de quelques jours, ils se

développent en colonies, en formant soit des points, soit des taches, visibles à l'œil nu. Selon Koch, la pureté des végétations dans la gélatine est indiquée, pour ce qui concerne les bactéries, en partie par leur aspect, leur couleur, leur forme, etc.

Dans un examen plus approfondi, on n'aperçoit cependant aucune différence *essentielle* entre cette répartition des germes dans la gélatine liquide et celle que l'on obtenait précédemment par des dilutions dans des liquides. La même incertitude subsiste, car ni l'examen macroscopique de l'aspect de la colonie, ni l'examen microscopique de son contenu, ne nous donnent la certitude qu'elle ne contienne *qu'une seule* espèce.

Le seul moyen de s'assurer de la pureté absolue d'une culture dans la couche de gélatine, est d'observer directement le germe isolé et d'en suivre le développement.

Hansen l'a fait pour les cellules de levure et il a élaboré la méthode suivante : la couche de gélatine formée par le liquide nutritif figé, est étalée de manière que l'on puisse voir au microscope où se trouvent les germes isolés. La position de ces germes est alors soigneusement marquée, et l'on est désormais à même de suivre pas à pas le développement et la multiplication de la cellule.

La plaque de verre est un couvre-objet d'à peu près 30 $\frac{m}{m}$ de diamètre. Celui-ci est fixé sur un anneau de verre qui est lui-même placé sur un verre plus épais, et qui constitue donc une de ces chambres humides décrites précédemment (voir fig. 2 page 10) qui est appropriée au but que l'on poursuit, et qui porte à la surface inférieure du couvre-objet une couche solide de gélatine. Le point essentiel de la méthode de *Hansen* est donc que contrairement à *Koch*, il suit d'une manière conséquente le principe, que le point de départ d'une culture pure doit être une cellule unique. Les germes doivent être tellement répartis, qu'il ne s'en trouve que relativement peu dans la couche de

gélatine; on laisse alors la chambre humide sous le microscope pour suivre directement la multiplication des germes ou bien l'on note, en divisant la plaque de verre en petits carrés ou en employant le marqueur, l'endroit où se trouvent les germes sûrement isolés, et l'on place l'appareil dans une étuve, jusqu'à ce que les colonies soient complètement développées. Dans le laboratoire de l'auteur on emploie des chambres humides (Fig. 9) dont les lames couvre-objets sont gravées de 16 carrés avec

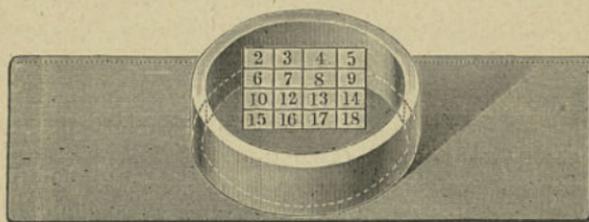


FIG. 9.

Chambre humide quadrillée et numérotée.

des numéros. La position des cellules est alors indiquée dans un dessin. On peut avoir, à un couvre-objet, 50 à 60 germes bien isolés. Quand les colonies sont développées, elles doivent être introduites dans le ballon au moyen d'un fil de platine ou cuivre préalablement rougi. Pendant l'ensemencement, la culture se trouve un instant à l'air et exposée à l'infection. Mais sur ce seul point faible, le jeu du hasard est réduit à son minimum, si l'opération décrite a lieu dans un espace restreint, exempt de germes, par exemple dans une petite caisse à parois de verre assez grande pour abriter les appareils et les mains de l'opérateur (voir page 18). De cette manière, l'ensemencement de la colonie se fait avec toute la sûreté possible. Du premier ballon, la culture pure peut être introduite sans infection dans des ballons toujours plus nombreux

et plus grands. La méthode de Hansen s'est donc autant que possible rapprochée du but, et elle s'emploie par conséquent partout où l'on se livre à des travaux exacts de ce genre.

Déjà, en 1883, Hansen a soumis la méthode des cultures sur plaques de Koch à un contrôle. Il prépara un mélange de deux espèces de levures pouvant être distinguées au microscope, c'est-à-dire le *Saccharomyces apiculatus* et une espèce du groupe de *Saccharomyces cerevisia*. Le mélange fut introduit dans du moût gélatiné et, après avoir été agité, il fut répandu sur une plaque de verre. Près de la moitié des taches formées contenait chaque espèce isolée, et dans une tache on trouva les deux espèces.

Plus tard, Miquel (1888) a appliqué un contrôle semblable pour les bactéries. Il prit dans une culture sur plaques, provenant d'une analyse d'air, 100 colonies qui furent introduites dans 100 ballons contenant du bouillon peptonisé. L'examen des végétations qui se développèrent dans ces ballons démontra que celles-ci contenaient 134 espèces différentes de microorganismes. Ceci provient sans doute de ce qu'en remuant le mélange gélatiné, il est très difficile, et souvent complètement impossible, de séparer toutes les bactéries et les autres germes les uns des autres. Cet examen prouve donc que la culture sur plaques employée pour les bactéries peut entraîner des erreurs considérables.

Holm (1891) a soumis, pour un grand nombre d'espèces de levures, la méthode à une analyse minutieuse, en employant pour la préparation de cultures absolument pures, le procédé de Hansen qui a été décrit plus haut. Le résultat de 23 séries d'essais effectués avec des mélanges distincts fut que, dans un seul cas, 100 colonies avaient été formées par 100 cellules ; dans toutes les autres séries on trouva des erreurs.

Dans le cas le plus défavorable 100 colonies avaient été formées par 135 cellules, et la moyenne de tous ces essais fit voir qu'en moyenne 100 colonies avaient été formées par 108 cellules. Par là il est démontré que le procédé sur plaques est également défectueux pour la levure.

La méthode de *Hansen* pour la culture pure de la levure a donc, comme avantage sur celle de *Koch*, son point de départ sûr. En répétant même plusieurs fois les cultures sur plaques, on ne sait cependant jamais si le but est réellement atteint ou non. En ce qui concerne les bactéries, il sera toutefois, dans la plupart des cas, impossible de s'assurer le point de départ d'une cellule unique. Dans des cas pareils, la culture sur plaques de *Koch* est toujours la meilleure méthode dont nous disposions,

8. — Détermination du nombre des cellules de levure.

Dans la fabrication de la levure pressée et dans la distillerie, il est important de déterminer le *pouvoir de multiplication* des cellules pendant le développement de la levure. Il faut naturellement que cela se fasse en déterminant le nombre des cellules qui se trouvent, aux différentes phases de la fermentation, dans un volume déterminé du liquide fermentant. Des expériences de ce genre ont été entreprises surtout par Delbrück, Hansen, Durst, Hayduck et Pedersen ; une détermination du nombre des bactéries fut en particulier faite par Fitz.

Le comptage s'effectue au moyen de l'appareil construit par Hayem et Nacet (fig. 10), que l'on employait d'abord pour le comptage des globules de sang (de là, nommé hématimètre). Ce fut feu le professeur Panum, à Copenhague, qui employa le premier cet appareil au comptage des microorganismes, en vue de déterminer leur puis-

sance de reproduction. L'hématimètre se compose, comme l'indique la figure, d'un porte-objet sur lequel est collé un couvre-objet d'épaisseur connue (par exemple $0,2 \text{ } \frac{\text{m}}{\text{m}}$), et dans le milieu duquel on a pratiqué une ouverture circulaire. On porte une petite goutte du liquide qui contient les cellules dans ce renforcement; un couvre-objet se place sur l'ouverture et repose ainsi sur la lamelle de

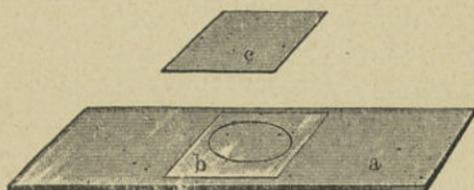


FIG. 10.

Hématimètre.

- a Porte-objet.
- b Couvre-objet avec ouverture circulaire fixé sur a,
- c Couvre-objet.

verre trouée. La goutte de liquide ne doit pas être assez grosse pour que cette pression lui fasse dépasser les limites de l'ouverture; mais elle doit cependant être assez haute pour toucher le couvre-objet superposé. On connaît alors l'épaisseur de la couche liquide. Afin de déterminer les deux autres dimensions et de pouvoir ainsi opérer avec un volume connu de liquide, on introduit dans l'oculaire du microscope, un de ces micromètres bien connus, fait d'une petite lame de verre, sur laquelle sont gravés par exemple 16 petits carrés. On connaît la valeur réelle d'un de ces carrés pour une combinaison donnée de lentilles, de sorte qu'en projetant l'image carrée sur l'objet, on délimite ainsi un prisme de volume connu. Dans certains cas, il est plus pratique de graver un système de carrés fins, de grandeur connue, sur le

porte-objet, dans le renforcement, comme l'a fait *Zeiss* à *Iéna*, sur les indications de *Thoma*. Par ce moyen, la mise au point du microscope sur les cellules qui se trouvent au fond de la chambre, sera également plus sûre.

Lorsqu'il ne s'agit que de déterminer la rapidité de la multiplication des cellules, c'est-à-dire d'indications répétées du nombre des cellules contenues dans *le même* volume, il est superflu d'en indiquer la grandeur et il suffira alors d'opérer toujours avec le même volume.

Il est toujours nécessaire que l'échantillon que l'on emploie, représente la *moyenne*; il doit, dans la plupart des cas, être dilué et agité pendant assez longtemps pour qu'il se produise une répartition homogène des cellules; la densité du liquide doit être telle que les cellules puissent y rester suspendues pendant quelques instants. Au moyen d'un tube capillaire, on en aspire une goutte que l'on porte dans l'appareil à compter, et que l'on recouvre du couvre-objet. On laisse reposer pendant quelques temps, pour que les cellules puissent se déposer au fond de l'espace limité; c'est pourquoi la densité du liquide ne doit pas être plus grande qu'il n'est admissible, pour que cette précipitation se fasse en temps convenable. Le moût employé dans les brasseries remplit ordinairement ces deux conditions.

Si l'on voit que le volume que l'on envisage contient trop de cellules pour qu'elles puissent être comptées exactement, il faudra diluer le liquide. Cela pourra également être utile sous d'autres rapports, soit pour prévenir la formation d'écume qui est souvent occasionnée par l'agitation du liquide, soit pour isoler les cellules qui sont souvent agglomérées et forment des colonies ou des grumeaux sans pouvoir être toujours séparées par l'agitation, soit enfin pour arrêter, au début de l'expérience, la fermentation et la reproduction des cellules de levure.

Hansen constata que l'acide sulfurique dilué au 1/10 remplissait généralement ce but ; l'acide chlorhydrique, l'ammoniaque et la soude caustique peuvent être employées, mais avec moins de succès.

Si l'on veut avoir une très forte dilution, on peut, après l'addition de 1 à 2 volumes d'acide sulfurique dilué, ajouter de l'eau distillée.

Si l'on mesure exactement les différents volumes des liquides, et surtout si l'on a soin de remuer fortement pendant longtemps pour bien répartir les cellules, on peut opérer avec une grande exactitude. Il faut toujours préparer deux dilutions égales et prendre des échantillons de chacune d'elles pour la numération. Il faut également déterminer par des expériences, dans combien de petits carrés il est nécessaire de compter les cellules, afin d'arriver à une moyenne aussi exacte que possible. On continue alors à compter et à déterminer de cette manière des moyennes jusqu'à ce que l'on obtienne des quantités n'ayant aucune influence sur la valeur moyenne.

Le nombre des déterminations nécessaires, et en général leur exactitude, dépendent de l'expérience de celui qui opère et du soin qu'il y apporte. Hansen a constaté qu'il suffisait ordinairement de compter les cellules dans 48 ou 64 petits carrés.



CHAPITRE II

ANALYSES DE L'AIR ET DE L'EAU

Si les analyses chimiques de l'air et de l'eau sont très anciennes, ce n'est guère que depuis quelques dizaines d'années que l'on a abordé ces études au point de vue biologique. Les matériaux que nous ont fournis de nombreuses et laborieuses recherches sont aujourd'hui assez étendus pour permettre d'affirmer en toute assurance que la composition microbiologique de l'air et de l'eau *peut* jouer un grand rôle, tant dans le domaine de l'hygiène que dans celui des fermentations. Ceci ressort déjà de ce fait que les germes susceptibles de provoquer des maladies dans des liquides en fermentation *peuvent exister dans l'air et dans l'eau*.

Tout ce côté de la physiologie et de la technique des fermentations n'est encore qu'en voie de développement et c'est avec quelque raison que l'on peut supposer déjà, dès maintenant, qu'au point de vue des fermentations, on a exagéré l'importance de l'eau et encore bien plus celle de l'air. Dans des conditions de fabrication normales, c'est-à-dire là où le travail se fait rationnellement d'après les principes reconnus aujourd'hui, ces deux facteurs — la composition microbiologique de l'eau et de l'air — auront rarement l'occasion d'intervenir d'une façon directe et sensible dans les opérations industrielles. Mais si les conditions de travail sont défavorables, les microorganismes

de l'eau et de l'air trouveront un champ tout préparé pour se fixer et se propager, et ce ne sera alors ni dans l'eau ni dans l'air, mais bien ailleurs, qu'il faudra chercher la cause de cette invasion microbienne.

L'importance des analyses biologiques de l'air et de l'eau consiste surtout en ce qu'elles nous donnent des indices certains des dangers que peut entraîner une fabrication anormale.

Les découvertes de *Spallanzani* et de ses successeurs sur la génération spontanée, mentionnées dans le chapitre précédent, donnèrent d'abord l'idée de l'étude des organismes microscopiques de l'air. L'importance capitale des microorganismes pour l'industrie de la fermentation fut rendue évidente par *Pasteur*, qui démontra que l'air contenait des bactéries ainsi que des ferments alcooliques.

Il sera intéressant de jeter un coup d'œil sur les différents procédés employés pour analyser l'air au point de vue des germes qu'il contient.

La plupart des *analyses de l'air* avaient pour but d'apporter de la lumière dans l'obscurité mystérieuse qui enveloppe la plupart des maladies contagieuses, qui sont presque toutes dues à l'action d'organismes microscopiques. Pour les organismes de la fermentation, il existe des recherches de *Pasteur*, et de plus récentes surtout de *Hansen*. Le savant français fit voir que ces germes étaient toujours suspendus dans l'air ; cependant on les trouve généralement déposés *en bien plus grande quantité sur les ustensiles servant aux expériences*. Les véritables ferments alcooliques sont relativement peu nombreux dans l'atmosphère, tandis que les germes des moisissures y sont plus répandus. *Pasteur* démontra également, comme le fit plus tard *Tyndall*, que les germes contenus dans l'atmosphère variaient tant au point de vue de leur nombre qu'à celui de leurs espèces. *Pasteur* obtint ces résultats

en plaçant dans différents endroits des cuvettes plates à grande surface, remplies de moût de bière, de moût de raisin ou d'eau de levure sucrée ; au bout de quelques jours on examinait le contenu de ces cuvettes au microscope. Pasteur employa encore dans ce but des ballons renfermant de l'air raréfié, appelés ballons à vide. En ouvrant le ballon, l'air y pénétrait avec ses germes.

Le savant qui, pendant les dernières années a, sans contredit, entrepris le plus grand nombre d'analyses de l'air est *Miquel*, directeur du laboratoire de Montsouris, près de Paris, installé tout spécialement dans ce but. Son collaborateur, *Freudenreich*, a également fourni des travaux très précieux dans le même ordre d'idées.

Miquel fit ses premières analyses au moyen de l'appareil nommé *aéroscope* (fig. 11) qui est construit de la manière suivante. Du sommet d'une cloche A, part un

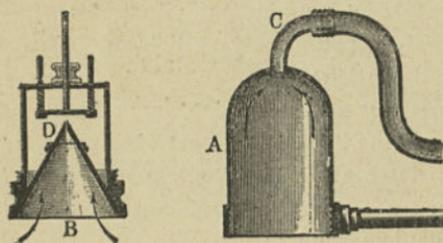


FIG. 11.
Aéroscope.

tube C servant à aspirer de l'air qui traverse ainsi la cloche. Un cône creux, dont l'ouverture B est tournée vers le bas, est engagé dans la cloche par un pas de

vis ; au sommet de ce cône D se trouve une petite ouverture qui permet à l'air aspiré de sortir.

Immédiatement au-dessus du cône, en regard de cette petite ouverture, est située une plaque de verre mince recouverte d'un mélange de glycérine et de glucose. Les corpuscules que l'air entraîne seront retenus en partie par ce mélange visqueux. Les microorganismes qui s'y déposent doivent être répartis aussi également que possible sur la plaque de verre pour être ensuite comptés au

microscope. Cette méthode est défectueuse en ce sens, qu'elle ne nous fournit aucune donnée sur le point le plus important, savoir, sur le nombre et sur la nature des germes retenus, vraiment susceptibles de développement.

Pour déterminer le nombre et l'espèce des germes susceptibles de développement, Miquel emploie maintenant l'appareil suivant (Fig. 12). Dans le ballon A est scellé le tube R dont l'extrémité inférieure est effilée et

touche presque le fond; la partie supérieure de ce tube porte un chapeau rodé H muni d'un tube qui renferme un filtre stérile de ouate, d'amiante ou de coton de verre (as). Le ballon porte d'un côté un tube étranglé au milieu (Asp), dans lequel se trouvent deux bouchons de ouate W' et W. De l'autre côté le ballon porte également un tube de verre qui

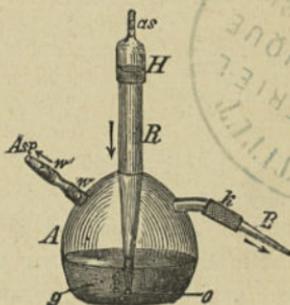


Fig. 12

Appareil de Miquel pour les analyses de l'air.

est relié par un tube en caoutchouc k, au tube de verre B, étiré en pointe et fermé à la lampe. On introduit de l'eau distillée dans le ballon, puis tout l'appareil est stérilisé. Lorsqu'on veut s'en servir, on met la tubulure Asp en communication avec un aspirateur, par exemple avec une bouteille remplie d'eau et munie à sa partie inférieure d'un robinet d'échappement, le chapeau H est enlevé, puis l'air entre par l'ouverture O, et passe lentement sous forme de petites bulles à travers l'eau G, pour ressortir par les tampons de ouate du tube Asp. Tous les germes de l'air n'étant pas retenus dans l'eau pendant le barbotage, le tampon de ouate W doit arrêter ceux qui ont été entraînés.

L'aspiration terminée, on remplace le chapeau H. En soufflant par la tubulure latérale Asp, on fait monter le liquide dans le tube R, pour qu'il recueille les germes qui auraient pu y adhérer. Puis en soufflant plus fortement, on pousse le tampon de ouate intérieur W dans le liquide, pour y disséminer les germes qu'il avait retenus. Après avoir purifié le tube effilé B dans une flamme, on en casse la pointe, puis on verse le liquide, en soufflant par la tubulure latérale Asp, dans un certain nombre de ballons renfermant du bouillon stérilisé.

Il s'agit ici de s'assurer, par des expériences préalables, jusqu'à quel degré on doit pousser la dilution du liquide infecté par l'air, pour qu'un certain nombre (par exemple la moitié) des petits ballons infectés restent stériles. Ou bien l'on peut aussi immédiatement diluer à différents degrés plusieurs échantillons de l'eau, et en infecter plusieurs séries de ballons (ensemencement fractionné). Si un certain nombre de ces ballons ne montre pas de développement, il y aura quelque probabilité pour que, dans chacun des autres ballons, dans lesquels il se produit une végétation, il n'ait été introduit qu'un seul germe. On peut alors, par un simple calcul, déterminer le nombre des germes susceptibles de développement dans le milieu employé, qui se trouvaient dans le volume d'air aspiré par le ballon original.

Par ces méthodes de recherches, *Miquel* trouva que des volumes égaux d'air, pris au même endroit, à des époques différentes, contenaient un nombre différent de bactéries. Une pluie prolongée purifie à un haut degré l'air de bactéries, et le nombre de celles-ci diminue tant que la terre reste humide, pour augmenter de nouveau progressivement avec le dessèchement du sol. Dans les saisons sèches, les bactéries sont donc, dans la règle, plus nombreuses, tandis que les moisissures, qui croissent le mieux dans l'humidité et dont les organes reproduc-

teurs s'élèvent librement dans l'air, abondent le plus dans l'atmosphère pendant ces périodes humides. On trouve l'air le plus pur en hiver ; l'air de la ville est moins pur que celui de la campagne ; un air exempt ou presque exempt de germes se trouve à la mer ou sur les hautes montagnes. Dans certains endroits, comme par exemple dans les hôpitaux, l'atmosphère se montra très riche en bactéries, ainsi dans un cas, 50 fois plus riche qu'au jardin de Montsouris.

Une méthode toute différente pour l'étude des organismes de l'atmosphère est celle qui est employée dans le laboratoire de *Koch*, et que *Hesse* développa d'une manière plus complète. Un tube de verre d'environ 1 mètre de longueur et de 4 à 5 centimètres de diamètre, est muni à un bout d'une membrane de caoutchouc perforée, recouverte elle-même d'une seconde membrane non perforée. On verse un peu de mélange de gélatine liquéfiée dans le tube, puis on bouche son autre extrémité avec un bouchon en caoutchouc, qui est traversé par un tube de verre contenant un tampon de ouate. L'appareil entier est alors chauffé suffisamment pour être rendu stérile, puis le tube est couché horizontalement pour que la gélatine, en se figeant, forme une couche dans la partie inférieure du tube. Quand on veut analyser l'air, on enlève le capuchon de caoutchouc, et l'on aspire lentement l'air par le tube. Les germes de l'atmosphère se déposent sur la gélatine et, l'aspiration terminée, on referme le tube et on le place dans un thermostat. Là, quelques-uns de ces germes produisent des colonies visibles qui peuvent facilement être complètes. En opérant avec un courant d'air suffisamment faible, on verra que les bactéries, qui souvent voltigent dans l'air, agglomérées en amas plus ou moins compacts, par exemple accrochées à des grains de poussière, à des filaments ou à de petits débris, sont plus vite précipitées

que les spores des moisissures. C'est pourquoi la gélatine contient en général dans la partie antérieure du tube spécialement des colonies de bactéries, tandis que les spores des moisissures se développent surtout dans la partie postérieure.

Hueppe, von Schlen et d'autres employèrent pour les analyses de l'air, de la gélatine liquéfiée, au travers de laquelle l'air était aspiré, et qui était ensuite étalée sur des plaques de verre.

Frankland, Miquel et *Petri* emploient des corps poreux solides pour la filtration de l'air dans des buts analytiques, par exemple de la poudre de verre, du coton de verre, du sable, du sucre, etc. Le *filtre de sable* dont se sert *Petri*, a 3 centimètres de longueur et 1,8 centimètre d'épaisseur. On le remplit de sable calciné fortement tassé, dont les grains ont une grosseur de 0,25 à 0,5 millimètre. On place deux de ces filtres l'un derrière l'autre, dans un tube de verre. Le premier filtre est destiné à retenir la poussière renfermant les germes qui entrent avec l'air aspiré; le second filtre sert à contrôler le premier. Le sable infecté de germes se répartit dans des boîtes de verre plates, puis on l'arrose de gélatine liquéfiée. Les poussières infectées donnent alors naissance à des colonies dans la gélatine.

Ces filtres à air pourront servir à l'expédition des échantillons d'air. Le destinataire pourra laver le sable dans de la gélatine ou encore mieux dans de l'eau stérilisée. Après avoir fortement agité l'eau, on l'emploiera immédiatement à l'ensemencement, goutte à goutte, dans des ballons renfermant un liquide nourricier, ou pour des cultures sur plaques.

Se basant sur de nombreuses expériences, *Miquel* fait contre l'emploi des plaques de gélatine dans ce but, l'objection que beaucoup de bactéries demandent une incubation de 15 jours dans la gélatine, si elles sont

exposées à une température de 20 à 22°, avant de produire des colonies distinctes. Mais d'autre part, il y a des espèces qui auront très rapidement liquéfié la gélatine, de sorte qu'elles rendront impossibles des observations poursuivies pendant quinze jours. C'est aussi le cas pour les moisissures qui, en peu de jours, peuvent se propager sur toute la plaque. On est, par conséquent, forcé de compter les colonies dans une phase si jeune de leur développement, que beaucoup d'entre elles ne seront pas encore suffisamment apparentes. Un autre inconvénient des plaques de gélatine est que l'on ne peut pas faire que le développement s'effectue à une température plus élevée que 23 à 24° C., parce que la gélatine devient liquide à cette température; or, beaucoup d'espèces de bactéries ne présentent un développement distinct qu'à des températures bien plus élevées. D'autres espèces ne se développent pas du tout dans la gélatine, mais seulement dans des liquides. Enfin, on fait ressortir comme une objection essentielle contre les plaques de gélatine, que beaucoup de colonies se composent de plusieurs espèces, ce que *Miquel* démontra en introduisant chaque colonie à part dans du bouillon de peptone, et en préparant des plaques de ces végétations. Cela provient aussi en partie — comme le fait remarquer *Petri* — de ce que les bactéries se présentent souvent dans l'atmosphère sous formes d'agglomérations qui se déposent directement sur la plaque de gélatine, ou qui sont mêlées à la gélatine épaisse, dans laquelle il sera toujours très difficile de séparer les individus en agitant.

Hansen fit ses analyses de l'air entre 1878 et 1882. Le but principal qu'il poursuivait était de fournir des lumières à l'industrie de la fermentation. Comme l'on sait, ses recherches sur le *Saccharomyces apiculatus* (1880) se basent sur des travaux de ce genre. Comme la question concernait les organismes qui se présentent dans la

brasserie, le choix du moût ordinaire comme liquide nutritif était tout indiqué. Les appareils employés étaient soit des ballons à ébullition ordinaires, recouverts de plusieurs couches de papier à filtrer passé préalablement par une flamme, dont on faisait bouillir le contenu pendant quelque temps, soit des ballons dans le genre des ballons à vide de *Pasteur*, dont le col était effilé et que l'on fermait à la cire pendant la cuisson. A l'aide d'un couteau à verre, on entamait la partie effilée un peu au-dessous de la pointe, afin de pouvoir la casser plus facilement pour donner accès à l'air.

Lorsque ces ballons étaient pleins d'air à analyser, on les refermait de nouveau à la cire, et on les agitait fortement pour mélanger le contenu de l'air aspiré avec le liquide. On les laissait ensuite reposer pendant un temps plus ou moins long — jusqu'à six semaines — puis on les examinait au microscope.

Hansen trouva souvent, par cet examen, que le moût restait clair et invariable en apparence, malgré qu'un développement ait eu lieu. On ne peut donc se fier ici à un examen à l'œil nu. Parmi les formes qui, à un degré peu avancé de développement, ne sont pas visibles à l'œil nu, il cite les suivantes : *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Bacterium aceti* et enfin le *Mycoderma cerevisiæ*. Même quand ces organismes ont formé de vigoureuses végétations, le liquide nourricier mentionné plus haut restera clair.

Il trouva de plus, que par l'emploi de ces ballons, on obtenait souvent des cultures pures, parce qu'une seule espèce avait pénétré avec l'air dans le petit ballon. Il était très rare que trois ou quatre espèces se trouvassent en même temps dans le même ballon. Cela provient de ce que chaque ballon ne reçoit qu'un petit volume d'air. Les avantages paraissent évidents. On n'arrive réellement à reconnaître ces différents germes que lorsqu'ils se sont

développés ; dans le cas où plusieurs germes pénétraient dans le même ballon, le germe le plus vigoureux arrêterait probablement les autres dans leur développement, de sorte que ces derniers ne seraient pas aperçus dans un examen ultérieur. Mais ce procédé nécessite en même temps le débouchage d'un grand nombre de ballons, ce qui rend cet examen compliqué et coûteux. Comme ces ballons ne nous renseignent que sur ce qui se trouvait dans l'atmosphère au moment du débouchage, on employait les matras à ébullition comme auxiliaires, en les laissant plus longtemps, jusqu'à 48 heures, reposer à la même place.

Après ces remarques préliminaires, donnons un court résumé des résultats obtenus par *Hansen*.

Il confirme les lois énoncées d'abord par *Pasteur*, à savoir que l'air de divers lieux voisins pouvait en même temps contenir des nombres différents et des espèces différentes d'organismes. Il trouva que cette règle s'appliquait aussi à des endroits voisins dans un seul et même jardin. Comme autres traits caractéristiques et significatifs pour la dissémination des organismes, *Hansen* cite que par exemple certains organismes qui se trouvaient en abondance sous les cerisiers d'un jardin, dans la première moitié de juillet, y faisaient complètement défaut dans la seconde moitié du mois ; puis que certains organismes, qui se montraient à certaine époque sous les cerisiers et non sous les vignes, ne se trouvaient plus tard que sous ces dernières. Comme preuve pour l'inégalité de la répartition des organismes, il nous montre que les ballons de la même série d'expériences, ouverts à la même place, offraient souvent des contenus les plus variés.

Les expériences faites avec les ballons à vide ont en outre démontré que les organismes de l'atmosphère forment souvent des groupes ou des nuages alternant

avec des espaces exempts de germes, ou n'en contenant que très peu d'isolés. Comme les organismes ne peuvent se produire dans l'air, mais qu'ils ont leurs foyers sur la terre, il en résulte que leur présence dans l'atmosphère doit dépendre des conditions de la surface de la terre, qui, à leur tour dépendent, à certains points de vue, du temps.

Les nombreuses analyses de *Hansen* ont en outre démontré que les *Saccharomyces* se présentent relativement rarement dans les poussières de l'air. Leur nombre augmente dans l'atmosphère de juin en août, de telle manière, qu'à la fin d'août et au commencement de septembre, les ballons sont souvent infectés par ces ferments, après quoi survient une diminution. Les microorganismes de cette espèce dans l'air libre, qui pénètrent dans les ballons à d'autres époques de l'année, doivent être considérés comme peu importants et accidentels, et n'entrent pas dans la règle générale. Comme les *Saccharomyces*, tel que le *Saccharomyces apiculatus*, passent selon toute probabilité l'hiver dans la terre et ont leur foyer de production sur les fruits doux et juteux, il s'ensuit que ces derniers doivent être considérés comme la principale source de l'infection. A la même époque de l'année, les bactéries se trouvent également en plus grande abondance. Ceci constitue un danger réel pour la fabrication, car le moût, qui est répandu en couches minces sur les bacs, est exposé à cette époque à une forte infection de la part des germes de l'air.

Dans les ballons, les bactéries sont un peu plus abondantes que les *Saccharomyces* et les moisissures apparaissent en nombre encore plus grand. Parmi ces dernières, on trouve dans les jardins surtout le *Cladosporium* et le *Dematium*, puis le *Penicillium*, plus rarement la *Botrytis*, le *Mucor* et l'*Oïdium*.

Après que *Hansen* eut ainsi démontré quelles sont les

espèces de microorganismes de l'atmosphère qui sont susceptibles de développement dans les ballons renfermant du moût stérilisé, il nous communiqua les résultats de ses examens des différents locaux d'une brasserie en général.

Quand les drèches sont exposées à l'air libre, elles dégagent, comme l'on sait, des vapeurs acides. Comme les drèches contiennent toujours un fort développement de bactéries, la question suivante se pose d'elle-même : quelle est la composition de l'air dans le voisinage des tas de drèche ? Hansen trouva que seulement 30 0/0 des ballons ouverts dans ces vapeurs étaient infectés, savoir 3,6 0/0 par des *Saccharomyces* et 2,4 0/0 par des bactéries, tandis que des expériences parallèles faites dans le jardin donnèrent une infection d'environ 44 0/0, dont 8,5 0/0 par des bactéries. L'air du voisinage des tas de drèche était donc moins riche en bactéries que celui du jardin. Comme partout ailleurs, ce furent les moisissures qui occasionnèrent l'infection la plus abondante. Après un examen plus approfondi, Hansen conclut que, sans nul doute, aucun des organismes apparaissant dans les ballons ne provient des drèches elles-mêmes. En tous cas, la grande richesse des drèches en bactéries ne répond pas au résultat mentionné ci-dessus, qui doit, selon toute probabilité, être expliqué ainsi, que dans la règle l'air ne tire des surfaces humides, aussi peu ici que dans d'autres cas, un contingent quelconque d'organismes.

Mais ceci ne doit pas être mal compris, et faire croire que l'on peut impunément entasser les drèches dans n'importe quel endroit et, après leur éloignement, en laisser les restes exposés aux intempéries de l'air ; il est évident qu'il en résulterait un grand danger. Quand ces résidus se dessèchent et voltigent sous forme de poussière dans l'air, une multitude de germes de bactéries sont soulevées en même temps, ce qui constitue, sans

nul doute, une source de nombreuses infections de bactéries. C'est pourquoi les endroits où il aura séjourné de la drèche pendant un certain temps, doivent être lavés à l'eau de chaux ou plutôt de chlorure de chaux (1).

Dans un corridor conduisant à la chambre où *se versait l'orge*, les ballons reçurent la plus forte infection qui fut jamais obtenue ; cet air était surtout riche en bactéries.

L'air des *germoirs* était également caractéristique ; il contenait toujours une très forte *végétation de moisissures*. Dans le cas dont il s'agit, cette végétation provenait de l'*Eurotium aspergillus glaucus*, qui était ordinairement rare. Sur le malt lui-même se présente comme toujours de préférence le *Penicillium glaucum*.

Le plus grand intérêt se rattache cependant à l'examen des différentes *salles de fermentation*, soit du Vieux-Carlsberg, soit de la brasserie « N ». Dans les premières, l'air était plus pauvre en organismes que dans tous les autres locaux examinés pendant cette analyse, par contre, un grand nombre de ballons fut infecté dans les caves de fermentation de la brasserie « N » (53,73 jusqu'à 100 0/0). Les organismes qui se présentèrent dans l'air de ces caves furent : le *Saccharomyces cerevisiæ*, le *Mycoderma cerevisiæ*, le *Saccharomyces pastorianus*, le *Saccharomyces ellipsoideus*, les *Toxula* et d'autres cellules semblables aux levures, puis les *Penicillium*, *Dematium*, *Cladosporium* et enfin des bactéries. Hansen put donc, par un heureux hasard, mettre en évidence les contrastes suivants, qui existaient dans l'état de l'air, dans les locaux les plus importants des deux établissements industriels

(1) Par le traitement des drèches dans les *appareils à sécher*, les germes *ne sont pas tués*. Ces appareils occasionneront donc des dangers très sérieux pour la fabrication, si la poussière des drèches séchées peut transmettre ses nombreuses bactéries au moult des bacs et des cuves de fermentation.

cités : d'un côté, un air presque exempt de germes, de l'autre un air fourmillant de germes. Il est hors de doute que le produit de la fabrication a dû aussi se ressentir de l'état dans lequel se trouvaient à cette époque les locaux nommés en dernier lieu, et nous nous trouvons ici en présence d'un des faits les plus importants, quand on envisage la chose au point de vue du praticien : *L'air de la cave de fermentation peut contenir tout un monde de ces germes qui attirent les plus grandes calamités dans l'industrie de la fermentation ; toutefois, il est possible de le maintenir vierge de tous ces germes, et il est hors de doute que d'une part la purification de l'air pénétrant dans la salle de fermentation par le passage à travers d'un bain d'eau salée, de l'autre part l'ordre et la propreté exemplaire, très sévèrement observés dans les caves de la brasserie du Vieux-Carlsberg, sont en rapport direct avec les résultats mentionnés plus haut. Les recherches de Hansen contiennent donc encore un avertissement qui ne saurait être assez répété.*

De nombreuses analyses zymotechniques de l'eau d'après les principes indiqués par Hansen (voir ce qui suit), ont été effectuées par J. Chr. Holm (laboratoire de Carlsberg) et au laboratoire de l'auteur.

Les expériences de Holm ont démontré que, de tous les différents microorganismes, ce sont les moisissures qui se développent le plus rapidement dans les ballons remplis de moût ou de bière et ce sont celles que l'on trouve ordinairement en plus grand nombre dans les ballons. On y constata le *Penicillium glaucum* et le *Mucor stolonifer*.

Après les moisissures, il faut citer les bactéries, fréquentes quand on emploie du moût comme liquide d'expérience, tandis qu'elles ne sont que peu représentées quand on ensemeince l'eau dans de la bière stérilisée. On y trouva le *Bacterium aceti*, le *B. Pasteurianum*, et une

forme qui rendait la bière filante et visqueuse, enfin souvent encore des espèces qui donnaient au moût une odeur désagréable, nauséabonde.

Les *cellules semblables aux levures* n'apparaissent que rarement dans les séries d'expériences. L'auteur mentionné plus haut n'observa aucun développement d'espèces de *Saccharomyces*, mais, cependant des formes de *Torula* et de *Mycoderma*.

Le nombre de ces germes variait aux diverses époques de l'année, sans toutefois paraître réglé d'après les saisons. La chute variable des eaux de l'atmosphère, la composition de l'eau à la surface du sol et celle de l'air avaient beaucoup d'influence. Le fait que les réservoirs d'eau placés à proximité des greniers à orge et à malt, sans être suffisamment garantis de la poussière, étaient fortement contaminés par des germes pouvant se développer dans le moût et la bière, a une grande importance pratique. On remarqua également que l'eau qui avait traversé les filtres de charbon renfermait bien plus de bactéries du moût que celle qui n'avait pas été filtrée.

Les analyses d'eau, faites depuis plus de dix ans au laboratoire de l'auteur ont donné les résultats principaux suivants : dans très peu de cas, les échantillons d'eau renfermèrent des *Saccharomyces* (levures de culture ou levures sauvages). Dans une seule série d'analyses, on trouva des espèces de *Saccharomyces anomalus* et de *Saccharomyces membranaefaciens*. Les bactéries formant des végétations visqueuses ou qui donnaient au moût une odeur putride, que *Holm* avait observées, se présentèrent très souvent. Quand une levure pure était infectée avec une de ces espèces, puis employée comme levain dans du moût houblonné, ces bactéries ne pouvaient ordinairement pas se propager, ce qui n'empêcha pas de trouver souvent une différence entre la bière fermentée ainsi et celle qui avait fermenté avec de la levure pure seule.

Les *ferments acétiques* n'étaient pas rares dans ces analyses et même en présence d'espèces concurrentes, ils manifestèrent leur activité dans les ballons. Dans quelques cas isolés, on observa, dans les séries d'expériences avec du moût, un développement souvent très fort, de formes de *Sarcina*, qui ne put être constaté dans les séries parallèles où l'on opérait avec de la bière stérile. Elles troublaient le moût en lui donnant une odeur particulière. Quant aux moisissures, on trouva le plus fréquemment : le *Penicillium*, puis l'*Aspergillus*, le *Mucor stolonifer*, le *Mucor Mucedo*, l'*Oidium lactis*, et des formes de *Dematium*. Dans les conduites d'eau de la brasserie, des couches continues de *Crenothrix* n'étaient pas rares.

On a pu constater dans bien des cas que le principal contingent de microbes, pouvant se reproduire dans le moût et la bière, était fourni par les réservoirs et les conduites. Se basant sur l'expérience acquise dans le cours des années, il est permis d'avancer que l'infection la plus dangereuse de l'eau provient de la brasserie même.

Les analyses biologiques de la *glace naturelle* et *artificielle* ont démontré que les deux sortes de glace peuvent contenir des organismes vivants, capables de se propager dans le moût et dans la bière. Les formes de *Sarcina* peuvent être introduites par la glace dans les liquides et y pulluler.

Une condition essentielle à observer pour les analyses de la grande masse d'eau, est de mettre tous les soins à la prise des échantillons, pour que ceux-ci représentent réellement la moyenne.

Se basant sur un grand nombre d'analyses comparées, Hansen indiqua la méthode suivante pour l'analyse zymotechnique de l'air et de l'eau.

Le principe servant de base à cette analyse de l'air et de l'eau, ressort de ceci : pour l'industrie pratique, comme par exemple la brasserie, il est seulement impor-

tant de savoir si l'air ou l'eau contiennent des germes susceptibles de se développer dans le moût ou dans la bière. Mais cela ne peut pas, comme on le croyait autrefois, être établi par la gélatine nutritive (1) employée dans l'analyse hygiénique de l'air et de l'eau. Contrairement à l'hygiéniste, le zymotechnicien a l'avantage de pouvoir opérer directement, avec le même liquide que l'on utilise dans la pratique, c'est-à-dire avec le moût. Tous les germes de maladie reconnus jusqu'ici avec certitude dans la bière, peuvent également se développer dans le moût. Les expériences comparées de Hansen ont montré d'une façon évidente, que l'emploi des gélatines introduisait de très graves erreurs. Ainsi, dans une série d'analyses comparées d'échantillons d'eau correspondants, les ensemencements dans de la gélatine nutritive de Koch donnèrent par exemple 100, 222, 1000, 730 et 1300 végétations dans 1 cm³ d'eau ; tandis que dans le moût, ils ne donnèrent que 0, 0, 6,6, 3 et 9 végétations, et enfin dans la bière ces échantillons d'eau donnèrent tous 0 végétation. Dans une autre série, la gélatine de Koch donna pour 1 cm³ d'eau 222 végétations, le moût gélatinisé en donna 30, mais aucun des ballons renfermant du moût et de la bière, et qui furent ensemencés avec de cette eau, ne présentèrent un développement. Dans ces cas, il ne se développa donc de cette multitude des germes vigoureux de l'eau, qu'un très petit nombre, ou aucun, dans le moût ou dans la bière.

Hansen a de plus démontré qu'il était faux d'employer d'abord la gélatine dans les analyses zymotechniques de l'air et de l'eau, et de semer ensuite les colonies formées dans des ballons contenant du moût. Il fut ainsi démontré par l'expérience que plusieurs des germes de bactéries qui se trouvent dans la poussière de l'air et dans

(1) Gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone.

l'eau peuvent, il est vrai, se développer dans la gélatine nutritive, mais non dans le moût ; mais parmi ces espèces, il en existe quelques-unes qui, après avoir formé une végétation nouvelle dans la gélatine, sont tellement fortifiées, qu'elles arrivent à se développer dans le milieu nourricier moins favorable qu'offre le moût. On est donc trompé dans ces cas. Une objection plus sérieuse encore contre le procédé sur gélatine, est que quelques organismes particulièrement importants pour nous, *n'arrivent pas à se développer* lorsqu'on les introduit directement dans la gélatine, dans l'état affaibli dans lequel ils se trouvent ordinairement dans la poussière de l'air et dans l'eau.

Se basant sur ces observations, Hansen indiqua le procédé suivant : une série de flacons Freudenreich contenant du moût stérilisé et de la bière stérilisée sontensemencés avec de petites quantités de l'eau à analyser que l'on emploie, selon les circonstances, diluée ou non diluée (1). On examine les flacons de culture après les avoir laissés reposer pendant 15 jours à une température de 23° C. Si une partie seulement de ces flacons présente un développement, tandis que les autres sont restés stériles, on peut admettre avec une certitude suffisante que chacun des premiers n'a reçu *qu'un seul germe*. Cela fournit des éclaircissements sur le nombre des germes susceptibles de reproduction qui se trouvent dans un certain volume, et cela donne en même temps aux différents germes des conditions plus favorables pour leur libre développement. L'examen exact nous renseigne alors sur la nature de ces germes.

Quoique par cette méthode, les cultures dans le moût

(1) Dans les analyses de *l'air*, les germes s'introduisent moyennant un aspirateur, directement dans l'eau, ou d'abord dans du coton et ensuite dans de l'eau.

donnent, en comparaison des cultures sur plaques, seulement un très petit nombre de végétations, le nombre des végétations dans le moût sera néanmoins dans bien des cas trop élevé, parce que dans les ballons, ces végétations peuvent se développer librement, sans concurrence. Quand le moût a été introduit avec de la bonne levure de culture dans la cuve de fermentation, un grand nombre de ces germes ne peut plus se faire valoir. En outre, les ballons qui offrent la formation de moisissures n'auront d'importance que pour la malterie, et non pas pour la brasserie proprement dite. Pour se rapprocher, dans l'étude des résultats, des conditions qui existent dans la pratique, on opère, d'après *Hansen*, de la manière suivante : les ballons infectés de levures et de bactéries se partagent en deux groupes : 1° ceux dans lesquels les végétations se sont montrées rapidement, et 2° ceux dans lesquels le développement n'apparaît que plus tard, par exemple cinq jours après l'ensemencement. Ces derniers contiennent des espèces qui se développent plus difficilement dans le moût ; celles-ci seront donc ordinairement réprimées dans la fabrication à cause de la concurrence avec la levure, et par conséquent elles auront une importance secondaire dans l'analyse de l'air ou de l'eau. *Hohn*, *Wichmann*, et d'autres ont exécuté des analyses d'après ce procédé qui est également adopté dans le laboratoire de l'auteur.

Pour le contrôle des filtres à air et à eau, on emploie de préférence le procédé sur gélatine de *Koch*.



CHAPITRE III

LES BACTÉRIES

A mesure que nos connaissances sur les bactéries s'étendent, la difficulté d'en donner une définition générale augmente. On les connaît sous toutes les formes, depuis les plus petits points ou globules, jusqu'aux filaments verts semblables aux algues, et elles se trouvent à peu près partout, dans les conditions les plus variées.

Suivant l'effet qu'elles produisent, on fait une distinction entre les *bactéries pathogènes* (bactéries de maladies), les *bactéries zymogènes* (bactéries de fermentation) et les *bactéries chromogènes* (qui forment des matières colorantes).

On fit la connaissance de ces formes en plaçant de petites quantités de substances les plus variées sous le microscope et en les observant avec de forts grossissements. Dans la viande en putréfaction, on trouva des corpuscules sphériques qui se multipliaient évidemment en se partageant suivant un diamètre ; le lait tourné offrit des corps courts, ayant la forme de bâtonnets ; dans des substances végétales en décomposition on trouva des corps sphériques plus gros et de longs fils fins ; dans la salive, au contraire, on vit des fils très fins enroulés en spirale et repliés, etc. Il était par conséquent tout d'abord indiqué de s'en tenir à ces formes et de les décrire comme autant d'espèces distinctes. C'est principalement à Cohn que revient une part de mérite sous ce rapport, car on lui

doit d'avoir établi la première classification systématique des bactéries.

Nous allons d'abord considérer de plus près les formes et les individus. Comme cela a été dit plus haut, les bactéries se présentent sous la forme la plus simple

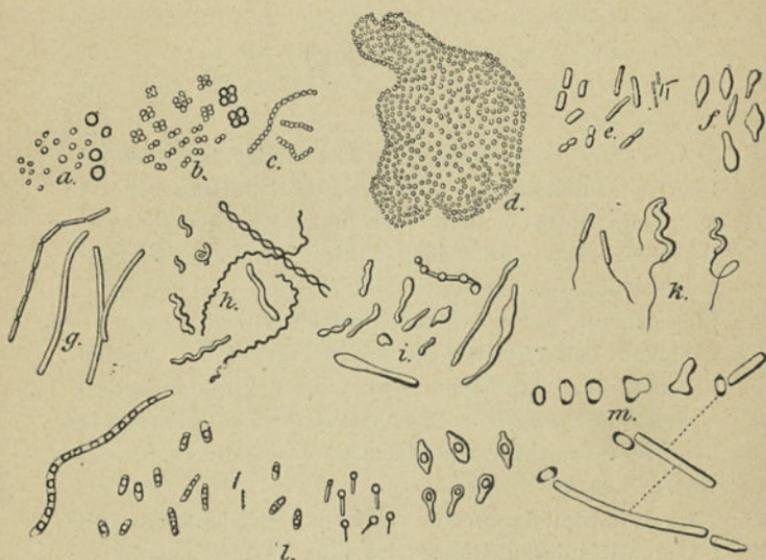


FIG. 13.

Formes de croissance des bactéries (en partie schématiques) : **a** coques, **b** diplocoques et formes de sarcina, **c** streptocoques, **d** forme de zoogléa, **e** bactéries et bacilles, **f** types de clostridium, **g** faux-fils, leptotrix, cladothrix, **h** vibron, spirille, spirochètes et spirulina, **i** formes d'involution, **k** bacilles et spirilles avec prolongement en forme de cils, **l** types de bactéries formant des spores, **m** germination d'une spore de bactérie (*Bacillus subtilis*).

comme des corps sphériques de grandeurs différentes, jusqu'à ceux qui ne s'aperçoivent plus qu'avec les grossissements les plus puissants, et qui ne se manifestent comme êtres vivants plus que par leur multiplication par cloisonnements. On distinguera donc ce que l'on nomme les *macrocoques* des *microcoques* (fig. 13 a). Quand les

petites sphères se présentent par couples de deux, on les nomme *diplocoques* (b) ; elles peuvent aussi apparaître par groupe de quatre — formes de *sarcina* (b) — ou bien former plusieurs rassemblements irréguliers, ou enfin des chaînes — *streptocoques* (c). Par une transition graduelle, les formes de coques se changent en celles des bâtonnets — *bactéries, bacilles* (e) — qui peuvent se présenter en différentes grandeurs, longueurs et grosseurs ; quand les bâtonnets offrent un renflement au milieu, ce qui les fait ressembler à un fuseau, il se produit le type *clostridium* (f). Un prolongement plus fort des bacilles fait naître les filaments — *leptothrix* (g) — qui peuvent, à leur tour, se présenter par la jonction dans le sens longitudinal de plusieurs bacilles, comme *faux-fils* (g), ou comme ramifications apparentes par une réunion particulière de plusieurs filaments — *cladothrix* (g). — Souvent les bacilles et les filaments sont ondulés ou tournés en forme de vis (h) ; quand les spires sont peu prononcées, on a la forme des *vibrions* ; quand elles sont plus accentuées, on a les formes des *spirilles* et *spirochètes* ; quand les fils s'entrecroisent comme des tresses, on nomme cette forme *spirulina*. On peut encore signaler les formes bizarres irrégulièrement gonflées ou écbancrées, que peuvent affecter plusieurs bactéries sans que la cause en soit exactement connue — les formes *d'involution* (i) ; elles sont souvent provoquées par des conditions d'existence défavorables, mais chez quelques espèces, elles font partie du développement normal (par exemple chez les bactéries acétiques).

Choisissons maintenant une de ces formes pour la soumettre à un examen plus approfondi avec un grossissement d'environ mille fois. Comme toute autre cellule, elle contient du protoplasma, une masse homogène, peu réfringente, dans laquelle peuvent se présenter çà et là de petites granulations, visibles surtout lorsque la cellule

ne se trouve pas dans un état de développement très vigoureux. Quelquefois il se trouve au milieu de la cellule une place plus claire que l'on doit envisager, par analogie aux plantes supérieures, comme un réservoir de suc, une vacuole. Quelques bactéries contiennent aussi certaines substances solides dans leur plasma, ainsi on trouve des globules de soufre dans certaines bactéries vivant dans de l'eau sulfurée. Il y a quelques espèces dont le plasma peut être, dans certains cas, coloré en bleu par de l'iode, ce qui permet d'admettre la présence de substances amylacées.

Ce protoplasma est entouré d'une *paroi cellulaire ou membrane*. Un examen par voie de colorations montre ordinairement que les couches extérieures de cette membrane sont gonflées et forment une masse gélatineuse, ce qui ressort tout particulièrement quand des flocons entiers de bactéries se trouvent amassés. Au point de vue chimique, il faut provisoirement admettre que la nature de cette membrane diffère en raison des différentes espèces. Il y en a où elle nous rappelle la cellulose des plantes supérieures, et d'autres au contraire où sa composition paraît ressembler plutôt à celle des matières albuminoïdes.

Beaucoup de bactéries contiennent des *matières colorantes* bleues, rouges, jaunes ou vertes, qui peuvent produire des colorations très intenses. Mais vue au microscope, la bactérie isolée n'apparaît que très faiblement colorée. Il n'a pas encore été déterminé exactement dans quelle partie la matière colorante se trouve située. Quelques variétés se distinguent par leur propriété d'être *luisantes* lorsqu'elles se trouvent dans certaines conditions de nutrition.

Une propriété remarquable de beaucoup de bactéries est leur *mouvement spontané*. Celui-ci s'effectue soit rapidement soit avec lenteur, les bactéries oscillant ou

tournant autour de leur axe longitudinal en décrivant des courbes déliées ou étroites. Un fort grossissement permet d'observer chez quelques-unes de ces formes mobiles des prolongements en forme de cils très fins (fig. 13 k); mais on n'a pu encore déterminer jusqu'à quel point ceux-ci doivent être considérés comme organes de locomotion; on suppose qu'ils se composent de fils plasmiques partant de l'intérieur des bactéries et qui sont enveloppés d'une membrane spéciale.

La *multiplication* des bactéries s'effectue par *segmentation* (*scissiparité*) qui a été observé dans ses détails chez les formes relativement grandes: les cellules s'allongent, il se forme de fines cloisons transversales qui augmentent peu à peu d'épaisseur et se divisent en deux parties; alors les fils se fractionnent en petits articles qui restent unis ou qui se séparent (fig. 13 g). Bien avant qu'il soit possible d'observer les traces de ces membranes transversales on peut, par la coloration du fil, reconnaître qu'il se compose d'une série de segments, dont chacun correspond à un des individus formés plus tard. Les filaments nouvellement formés se trouvent alors tous dans un même plan. Chez les microcoques (les formes de sarcina et les pédiocoques), on a aussi observé une division suivant deux ou trois directions de l'espace.

Par l'étude des formes de développement des bactéries effectuée de la manière indiquée plus haut, il a été démontré, principalement par Zopf, qu'une seule et même espèce de bactérie peut se présenter sous des aspects très variés par exemple comme spirille, leptothrix, bacille, bactérie et coccus, et nous obtenons par là l'importante connaissance relative à l'histoire de ces plantes, que ces noms ne désignaient très souvent que des formes de croissance de l'espèce, et non des espèces distinctes. La question qui se pose est celle-ci: *quelles sont les conditions nécessaires pour qu'une espèce apparaisse sous l'une ou*

l'autre de ces formes déterminées ? Sur ce point, nous ne savons jusqu'à présent que très peu de chose, mais on a observé que sous ce rapport la température et le milieu nourricier peuvent exercer une grande influence (voyez les recherches de Hansen sur les bactéries acétiques).

Il y a en outre beaucoup de bactéries qui forment des *spores* de la manière suivante (fig. 13, I, m. fig 21 B) : le plasma dans la cellule devient plus foncé, souvent visiblement granuleux ; puis apparaît un petit corps très réfringent, qui grandit rapidement, et qui s'entoure d'une membrane. En même temps, la plus grande partie du reste du plasma cellulaire disparaît en servant à former la spore qui apparaît renfermée dans un liquide clair qui, à son tour, disparaît peu à peu ; enfin la paroi cellulaire se resserre et finit par ne former plus qu'un appendice prêt à tomber de la spore mûre. Dans bien des cas, la cellule mère se gonfle pendant la sporulation (fig. 13 I, 21 B). Souvent on nomma cet organe *spore durable* et cela pour deux raisons : d'abord parce que la spore possède en effet bien plus de durabilité et une résistance bien plus grande contre des influences de l'extérieur que les fils végétatifs (1), et ensuite, parceque la formation des spores n'a généralement lieu que lorsque la matière nutritive de la végétation est épuisée ou qu'elle paraît être devenue inefficace pour le développement végétatif ultérieur des organismes. La spore sert donc à conserver la vie pendant cette période critique.

Dès qu'il se présente des conditions favorables de nutrition et de température, *la spore germe*. Elle augmente d'abord de volume et son contenu perd de sa puissance

(1) Pour tuer les spores, par exemple du bacille du foin (*bacillus subtilis*, fig. 13 m), une ébullition à 100° c. pendant trois heures sera nécessaire, tandis qu'à cette même température, les fils végétatifs périrent déjà au bout de 20 minutes.

réfringente. De la spore naît alors une bactérie et l'on voit quelquefois la paroi de la spore se déchirer ou se diviser en deux soupapes (Fig. 13, 21). Le fil, une fois développé, se multiplie de la manière ordinaire.

Souvent, on divise les bactéries en « *endospores* » et en « *arthrospores* » ; les premières forment leurs spores à l'intérieur des fils végétatifs tandis que d'après les études faites jusqu'à maintenant, les dernières n'ont pas encore montré une pareille sporulation intérieure ; ici ce sont des membres détachés de cellules végétatives qui deviennent le point de départ de nouvelles générations végétatives. Une différence entre les spores et les autres articles, pouvant être constatée au microscope, n'apparaît que dans quelques cas, lorsque les contours des cellules durables s'épaississent (*Cladotrix*, *Leptothrix*, *Bacterium Zoppi*.) Par des recherches prolongées, on arrivera peut-être à trouver aussi chez les espèces de cette dernière catégorie, des spores endogènes. Quant à prétendre que les membres mentionnés qui ont été séparés puissent être mis en parallèle avec les spores, ceci est une supposition encore insuffisamment fondée.

Pour terminer, nous devons encore mentionner un élément dans l'étude des formes des bactéries, la *formation des zooglyphes* (Fig. 13 d). Dans toutes les branches de l'industrie de la fermentation, il est connu que dans les endroits où le nettoyage n'est pas rigoureusement surveillé, il peut se former des amas gélatineux et gras, qui augmentent peu à peu d'épaisseur. La cause en est ordinairement un développement de bactéries où les cellules se groupent très près les unes aux autres, tandis que les couches gélatineuses extérieures enflent fortement. Pendant la multiplication ininterrompue des bactéries, la couche visqueuse augmente d'épaisseur et peut en même temps affecter certaines formes caractéristiques. Ces masses visqueuses — connues dans la sucrerie sous le nom de

« gomme de sucrerie » ou « frai de grenouilles » — se présentent sur des corps solides aussi bien que dans des liquides.

Cette masse gélatineuse, claire, hyaline, est invisible dans la préparation microscopique. Par un traitement spécial — par exemple en immergeant la préparation pendant quelques minutes dans du bouillon à 33° C. — les masses gélatineuses ou « capsules » absorbent ordinairement des matières colorantes, ce qui rend possible l'observation des formes.

Beaucoup de bactéries résistent très bien aux basses températures. Ainsi *J. Forster*, *B. Fischer*, *Miquel* et d'autres constatèrent l'existence de bactéries pouvant très bien se multiplier à 0°. Certaines espèces supportent un froid de — 70°, — 110°, même de — 213° sans être tuées (*Fischer*, *Pictet* et *Yung*). Par contre on a trouvé un certain nombre de bactéries *thermophiles* auxquelles la chaleur est favorable. Le *Bacillus thermophilus*, décrit par *Miquel*, se multiplie encore énergiquement à 70° C., tandis que le développement s'arrête à 42° C. D'autres espèces ne se développent qu'à 60° C. Dans des excréments d'animaux on trouva plusieurs espèces assez fréquentes qui croissaient encore à 75° C., tandis qu'elles ne se multipliaient plus à 39° (*L. Rabinowitsch*). Parmi les bactéries thermophiles il faut compter plusieurs ferments lactiques et probablement aussi les espèces de la fermentation du tabac. Parmi les bactéries de ce groupe *F. Cohn* trouva un micrococcus qu'il reconnut être le promoteur de l'échauffement qui se produit souvent dans les déchets de coton, sans cause apparente.

Les bactéries sont très sensibles à l'action de la lumière et beaucoup d'entre elles sont rapidement tuées lorsqu'elles sont exposées aux rayons directs du soleil. Ceci joue un grand rôle dans la purification spontanée des fleuves (*H. Buchner*).

L'influence de l'*agitation mécanique* sur les bactéries et autres microorganismes est très variable. De nombreuses expériences permirent à *Meltzer* de constater qu'une légère agitation était favorable à la vie et à la croissance des microorganismes. Un certain degré d'agitation entraîne la plus grande rapidité de multiplication qui diminue ensuite, à mesure que l'agitation augmente, pour l'arrêter finalement. L'optimum et le maximum de croissance varie d'ailleurs suivant les espèces.

Pasteur fit la découverte importante qu'il y a des bactéries et d'autres microorganismes qui n'ont pas besoin d'oxygène libre pour vivre et qui, privés de ce gaz, occasionnent une vigoureuse décomposition du liquide fermentatif. Au point de vue biologique, il distingua par conséquent, deux classes de microorganismes et nomma ceux dont nous venons de parler *anaérobies* et les autres *aérobies*. Plus tard *Duclaux* fit surtout remarquer qu'entre ces deux extrêmes il existait des formes intermédiaires. Comme exemple de bactéries anaérobies, on peut citer la bactérie de la fermentation butyrique de Pasteur.

Nous donnons ici un aperçu des principales espèces qui jouissent d'une importance particulière dans l'industrie de la fermentation.

1. — Bactéries acétiques.

C'est *Hansen* qui nous donna le premier une description détaillée de la biologie et de la morphologie des bactéries acétiques.

Déjà, en 1837-38, *Turpin* et *Kützing* émirent l'opinion que la fermentation acétique était provoquée par un mi-

croorganisme et *Kützing* représenta cette bactérie et la décrivit sous le nom de *Ulvina aceti*. S'appuyant sur ses devanciers, *Pasteur* donna d'abord dans son Mémoire (1864) et surtout dans ses « *Etudes sur le vinaigre* » (1868) les preuves expérimentales de la justesse de cette opinion et il basa là-dessus un procédé pour la fabrication du vinaigre. Il supposa que la fermentation acétique était provoquée par une seule espèce qu'il nomma *Mycoderma aceti*. Des recherches ultérieures ont démontré qu'il existe plusieurs espèces de bactéries acétiques. *Il n'est donc encore nullement question, chez Pasteur, de l'emploi d'une espèce déterminée et choisie.* Son procédé consiste à donner une grande surface au liquide employé — deux parties de vin clair et une partie de vinaigre de vin — et de semer sur cette surface un jeune voile mycodermique. Quand la température, la composition du liquide et en général toutes les conditions sont favorables, l'acétification se fait, de cette manière, plus rapidement que par l'ancien procédé d'Orléans. L'installation est, paraît-il, moins coûteuse et la perte d'alcool n'est guère plus forte que dans cette dernière méthode.

Le procédé Pasteur n'est cependant pas appliqué, autant que nous avons pu découvrir. La cause d'incertitude dans les résultats peut être cherchée dans le fait que la composition du liquide nourricier varie, mais surtout dans le fait que *la culture des bactéries n'était pas une pure*, et qu'elle pouvait par conséquent contenir des espèces de bactéries possédant des propriétés différentes, demandant des conditions vitales différentes et développant par conséquent des produits divers en quantités variables. Ceci se fera également sentir dans les cas où la végétation ne se compose que d'espèces qui, toutes, peuvent produire du vinaigre de vin. Déjà en 1879, *Hansen* a démontré que les formes du *Mycoderma aceti* cachaient au moins deux espèces distinctes, connues aujourd'hui sous les noms *Bact.*

aceti et *Bact. Pasteurianum* et l'on distingue à présent toute une série d'espèces.

La culture absolument pure d'une espèce systématiquement choisie doit, dans cette industrie aussi, former le point de départ. — L'ancien procédé d'Orléans est encore toujours prédominant en France. D'après ce procédé où l'on opère à une température d'environ 20° C., on verse le vin à acidifier dans des tonneaux à moitié pleins, sur lesquels l'air a largement accès. L'acétification se fait comme dans le procédé Pasteur, le liquide se couvrant également d'un voile mycodermique. Dans d'autres contrées on emploie ordinairement la méthode allemande dite « *vinaigrerie rapide* » où le liquide à acidifier (de l'alcool dilué additionné de vinaigre) exposé à un fort courant d'air, est réparti en gouttelettes sur de grandes surfaces (des copeaux de hêtre) afin de le faire entrer en contact intime avec l'air. Il n'a pas encore été fait de recherches sur les microorganismes qui agissent dans ce dernier procédé de fabrication. L'emploi de cultures pures méthodiquement choisies ne se fera, espérons-le, pas trop longtemps attendre.

Tandis que dans son ouvrage, *Pasteur* ne soutient pas formellement l'hypothèse que l'oxydation de l'alcool en acide acétique provoquée par des bactéries acétiques, soit un processus de nature purement physiologique, *Adolphe Mayer* formula et prouva la justesse de cette opinion, et *Hansen* aussi fait ressortir comme certain que l'acétification est généralement provoquée par l'influence de bactéries.

Pasteur démontra que l'acide acétique provenant de l'oxydation de l'alcool éthylique se réduisait, par une oxydation prolongée, en *acide carbonique* et en *eau*. Depuis, ceci a été confirmé par *Ad. J. Brown*, à qui nous devons les recherches les plus complètes sur les fonctions chimiques des bactéries acétiques.

Les recherches de *Hansen* font partie de celles qui, les premières, nous montrèrent qu'une fermentation déterminée pouvait être produite non seulement par *une seule* mais par plusieurs espèces de bactéries; ces recherches nous donnent en même temps les premières preuves expérimentales que la même espèce pouvait se présenter sous des formes très différentes. L'exactitude de ces résultats fut constatée plus tard par *Zopt, De Bary, Ad. J. Brown* et depuis cette époque, maints exemples ont été découverts.

Au moyen de ses essais de coloration sur le *Bact. (Myco-derma) aceti*, *Hansen* découvrit, en 1879, que sous ce nom se cachaient au moins *deux espèces distinctes*, dont l'une — comme la plupart des autres bactéries — se colore en jaune par l'iode, tandis que l'autre en reçoit une teinte bleue. Pour la première, il conserve l'ancien nom *Bacterium aceti*, tandis qu'il nomme l'espèce colorée en bleu, d'après Pasteur, *Bacterium Pasteurianum*. Une belle coloration bleue par des solutions d'iode ou d'iodide de potassium s'observe sur les formations de voiles sur le moût ou la bière, ainsi que sur les végétations à la surface du moût gélatiné. Les végétations au contraire qui se développent sur l'eau de levure et sur la gélatine nutritive, se colorent en jaune; de vieux voiles sur de la bière of-frent aussi la réaction jaune. C'est la *matière gélatineuse* partant de la paroi cellulaire qui se colore en bleu. Plus tard, ce même chercheur trouva une troisième espèce.

Ces trois espèces se distinguent de la manière suivante :

Le *Bacterium aceti Hansen* (Fig. 14) forme sur de la bière double (bière de fermentation haute, riche en extrait avec environ 1% d'alcool), à 34° C. au bout de 24 heures, un *voile mucilagineux* et uni. Le mucus n'est pas coloré par l'eau iodée ou par la solution iodée d'iodure de potassium. Les cellules de ce voile sont des bâtonnets étranglés en

leur milieu, réunis sous forme de chaînes ; rarement on rencontre des bâtonnets plus allongés ou des filaments, avec ou sans renflements. Entre 40° et $40^{\circ} 1/2$ il se forme de longs filaments minces. Cultivée sur plaques avec du moût gélatiné à 23° , cette bactérie développe des colonies à bords ronds, rarement étoilés, qui paraissent grises à la lumière directe, bleuâtres à la lumière par transparence ; elles consistent

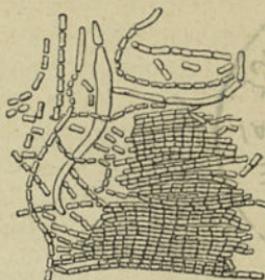


FIG. 14.

Bacterium aceti d'après Hansen

principalement en bâtonnets libres. Dans du bouillon de peptone gélatiné, les colonies sont entourées de zones lacteuses, dont elles sont séparées par une zone plus claire ; plus tard les zones extérieures peuvent s'iriser. Ensemencée en gouttelettes dans du moût gélatiné, cette bactérie développe à 23° au bout de 18 jours, de larges colonies unies, circulaires et dentelées, ou en forme de rosettes. Dans de la bière double, le maximum de la température de croissance se trouve à 42° , le minimum de 4 à 5° .

Cette espèce se présente généralement dans les bières de fermentation haute et basse.

Le *Bacterium Pasteurianum* Hansen (Fig. 15) forme sur de la bière double à 34° un voile sec qui se fonce et se plisse rapidement. Dans de jeunes voiles vigoureux sur la bière ou le moût, le mucilage qui entoure les cellules, est coloré en bleu, lorsque la température est favorable, par l'eau iodée et par une solution iodée d'iodure de potassium. Les cellules des voiles forment de longs chapelets et sont généralement plus grandes, surtout plus épaisses que celles de l'espèce précédente. Les filaments qui se présentent à 40° - $40^{\circ} 1/2$ sont aussi un peu plus épais que

ceux du *Bacterium aceti*. Dans les cultures sur plaques

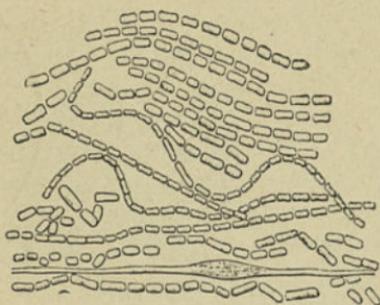


FIG. 15.

Bacterium Pasteurianum d'après Hansen.

avec du moût gélatiné, à 23° les colonies ressemblent à celles de l'espèce précédente, elles sont cependant un peu plus petites et consistent principalement en chapelets. Dans du bouillon de peptone gélatiné,

les colonies se comportent comme celles de l'espèce précédente. L'ensemencement dans du moût gélatiné montre, à 23° au bout de 18 jours, des colonies légèrement convexes, plissés, rondes, à bords réguliers ou légèrement dentelées. Dans la bière double, le maximum de la température de croissance est de 42°, le minimum de 5° - 6°.

Cette espèce est fréquente dans les bières de fermentation haute et basse.

Le *Bacterium Kätzingianum* Hansen (fig. 16) forme sur de la bière double un voile sec, qui s'élève au-dessus du liquide en adhérant à la paroi du ballon.

Une coloration en bleu du mucilage a lieu dans les mêmes conditions que pour le *B. Pasteurianum*. Le voile consiste en petits bâtonnets, qui sont ordinairement libres ou accolés à deux, mais forment rarement



FIG. 16.

Bacterium Kätzingianum d'après Hansen.

des chapelets. Les formes de filaments à 40-40° 1/2 ressemblent à peu près à celle du *B. Pasteurianum*. Les cultures sur plaques avec du moût gélatiné à 25° donnent des colonies identiques à celles de l'espèce précédente. Elles consistent principalement en bâtonnets courts, libres. Les colonies du bouillon de peptone gélatiné ressemblent aussi à celles des deux espèces décrites plus haut. Par l'ensemencement en gouttelettes dans du moût gélatiné à 25°, on obtient, au bout de 18 jours, des colonies pareilles à celles du *B. Pasteurianum*, mais à surface unie, sans pli. Sur de la bière double gélatinée, ces colonies sont visqueuses, tandis que celles des deux espèces précédentes ont une surface sèche.

Dans de la bière double, le maximum de la température de croissance est à 42°, le minimum entre 6 et 7°.

Cette espèce a été trouvée dans de la bière double.

Une espèce qui se distingue essentiellement de celles que nous venons de mentionner, est le *Bacterium xylinum*, assez fréquente en Angleterre, où on la rencontre dans les vinaigreries. Ad. J. Brown, qui l'a étudiée principalement au point de vue chimique, nous en a donné une description en 1856. Elle forme une peau dont le mucilage devient cartilagineux, dur et coriace; la végétation remplit peu à peu tout le liquide nourricier.

Mais cette espèce manifeste encore un autre caractère, qui la distingue particulièrement des trois précédentes: par la réaction cellulosique qui se produit dans son enveloppe mucilagineuse, et qui n'a pu être observée dans le mucilage des trois espèces décrites par Hansen. Peters, Vermisheff, Duclaux, Lindner et Zeidler nous ont aussi donné la description de bactéries acétiques. Ce dernier observateur trouva dans de la bière de garde une forme mobile, qu'il nomme *Thermobacterium aceti*.

M. Henneberg a aussi décrit une espèce à cellules mobiles, le *Bacterium oxydans*. D'après les indications de

Zopf, il trouva cette espèce dans de la bière de fermentation basse, qui avait séjourné dans des cuvettes à 25-27°. Elle forme sur gélatine des colonies rondes, qui montrent plus tard des ondulations irrégulières ou des ramifications dentelées. Sur de la bière stérile, elle développe des voiles très mous, composés de plusieurs ilots qui adhèrent aux parois des vases. Les jeunes voiles se composent de groupes de deux cellules, plus tard de longs chapelets. La bière est troublée par cette espèce. Dans le stade, où les cellules sont pour la plupart réunies à deux, il se forme souvent des *essaims*. Sur de la bière à 36°, la végétation consiste presque complètement en filaments longs et égaux. Cette espèce montre aussi, par exemple sur de la bière à 26°, des formes irrégulièrement gonflées. Les cellules ne sont pas colorées en bleu par l'iode. La température optimale de croissance paraît être entre 20 et 23°. La température limite pour la formation des essaims a été constatée à 44° pour une culture de 25 heures. La température de destruction se trouve, dans la chaleur humide, entre 55 et 60°, dans la chaleur sèche, entre 97 et 100°. L'oxydation de l'alcool en acide acétique est la plus active de 27-23°.

Les recherches détaillées de *Hansen* sur les bactéries acétiques eurent une importance considérable pour la biologie et la morphologie des bactéries en général, car elles nous ont donné des éclaircissements sur un des facteurs qui sont en rapport de la cause à l'effet avec le polymorphisme des bactéries.

Les diverses espèces de ferments acétiques étudiées par *Hansen* se présentent sous trois formes essentiellement différentes, qui dépendent de la température : les *chaînes* ou *chapelets* composés de bâtonnets courts, les *longs filaments* et les formes *gonflées*. Sur de la bière double, qui est un milieu très favorable à leur développement, ces espèces donnent à toutes les températures entre 5 et 34°

des végétations de chapelets qui croissent le plus activement à 34°. En ensemençant une parcelle de ce jeune

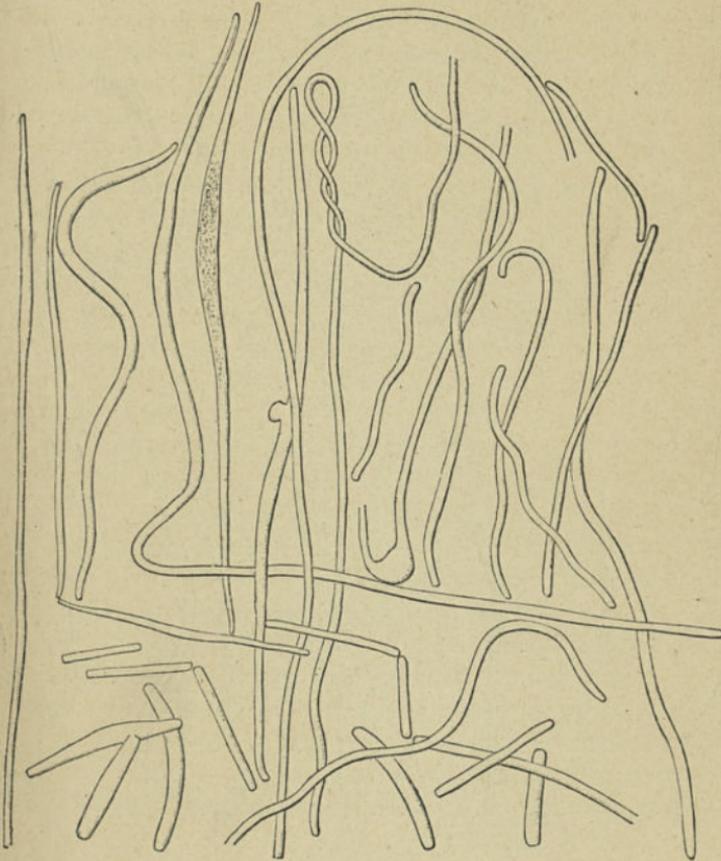


FIG. 17.

Bacterium Pasteurianum. Formes de filaments après culture de 24 heures dans de la bière double, à 40-40° 1/2°, d'après Hansen.

voile sur un liquide nourricier frais, à 40-40° 1/2, les cellules développent déjà au bout de quelques heures de

longs filaments (fig. 17). Chez quelques espèces, ceux-ci

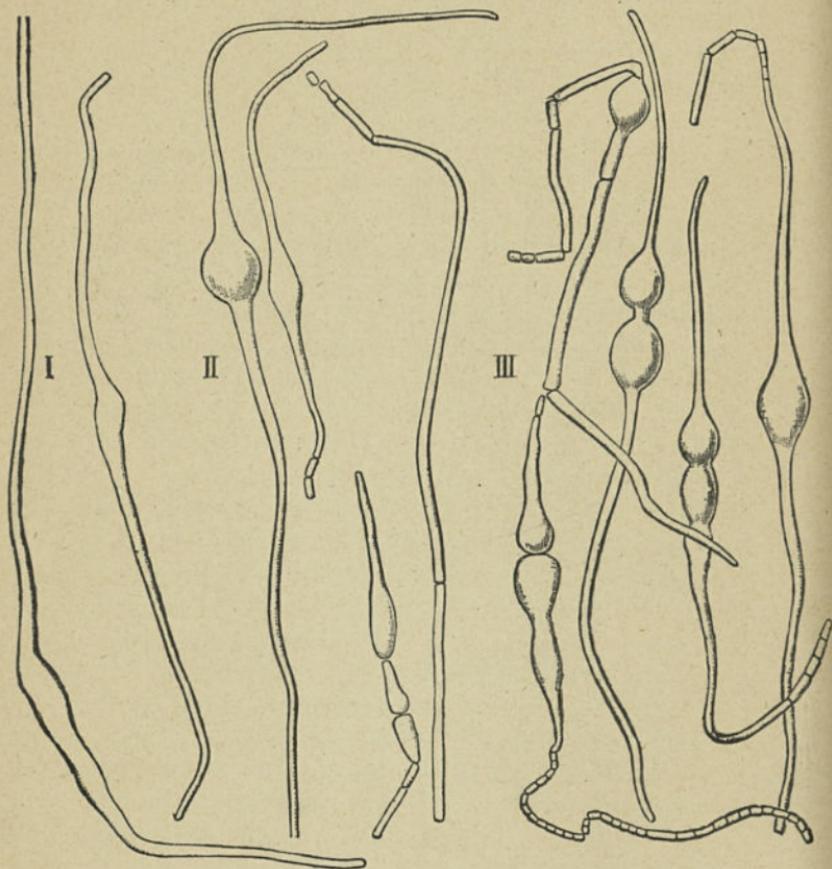


FIG. 18.

Bacterium Pasteurianum. Transformation des filaments en formes gonflées et en chapelets, après culture dans de la bière double à 34°, d'après Hansen.

peuvent atteindre une longueur dépassant 500 μ (¹), tandis

(1) 1 μ = 0,001 millimètre.

que les articles des chaînettes n'atteignent que 2 à 3 μ . Si on porte cette végétation de longs filaments à 34°, il en résulte de nouveau une transformation en *chapelets*. Pendant leur croissance à cette température, les filaments gagnent, non seulement en longueur, mais encore considérablement en épaisseur, ce qui donne naissance à ces *formes gonflées* (fig. 18) qui se présentent sous tant d'aspects variés, avec toutes les modifications imaginables. Alors les filaments se divisent en petits articles pour produire la forme typique des chaînettes. Ce ne sont que les parties les plus épaisses des filaments gonflés qui restent indivisées et finissent par être résorbées. Les renflements forment donc un appendice régulier de ce cycle d'évolution, dans lequel nous avons un bel exemple de l'influence qu'exerce la température sur la variabilité des formes.

Des recherches de Lafar ont démontré que les espèces *Bacterium aceti* et *Bacterium Pasteurianum* varient aussi au point de vue chimique et physiologique-chimique. Elles donnent dans de la bière stérilisée des équations zymotiques différentes. A des températures supérieures le *Bact. Pasteurianum* développe une activité acidifiante plus forte que celle du *Bact. aceti*; par contre, ce dernier put encore provoquer une fermentation énergique à 4-4° 1/2, tandis qu'à cette même température le *Bact. Pasteurianum* ne produit plus de quantité mesurable d'acide acétique. Entre 33 et 34° le *Bact. Pasteurianum* produit le maximum d'acide acétique au bout de 7 jours, à savoir 3,3 0/0 en poids, qui retomba alors à 0. Après que le maximum de la quantité d'acide eût été atteint, les formes de cellules irrégulièrement gonflées apparurent dans la végétation. Celles-ci sont à considérer comme le résultat d'une dégénération pathologique, due à ces conditions de nutrition défavorables (formes d'involution); des recherches exactes sur ce phénomène

manquent toujours encore. Les formes déterminées par *Hansen* dans la marche du développement, mentionnée plus haut, ont une importance physiologique toute différente, car elles s'y trouvent en vigoureuse croissance, ce qui prépare la végétation pour la formation nouvelle qui doit suivre.

Dans la fermentation des brasseries, des distilleries et dans celle du vin, ces bactéries jouent un rôle considérable, qui les fait redouter. C'est surtout dans le vin qu'elles causent parfois de graves dommages, car si elles arrivent à un fort développement, le vin est inmanquablement perdu. Dans les brasseries de fermentation basse, elles font ordinairement moins de tort, attendu que leur développement demande une température élevée et beaucoup d'air.

Elles ne peuvent donc pas se faire valoir dans une cave à bière bien conditionnée. Les recherches de *Hansen* ont démontré que le *Bact. aceti* et le *Bact. Pasteurianum* peuvent vivre pendant toute la durée du repos de la bière, que l'infection se soit produite au début ou à la fin de la fermentation principale. Mais pendant toute la durée de la fermentation, l'infection ne se manifeste pas, ni par le goût, ni par l'odeur de la bière. Quand la bière était soustrée en bouteilles et exposée à une température plus élevée, les bactéries recommençaient à croître ; mais si les bouteilles étaient *bien bouchées*, la bière ne devenait pas acide. Le même résultat fut atteint en contaminant la bière déjà terminée. — Si, par contre, les bouteilles sont mal bouchées, la végétation rend la bière acide.

Dans les brasseries de fermentation haute, où la fermentation se fait à de plus hautes températures, ces bactéries peuvent, par contre, causer de grands ravages avant même que la bière ne sorte de la brasserie.

La constatation que, parmi ces bactéries aérobies, les espèces plus connues n'exercent aucune influence *ni sur*

la couleur ni sur la limpidité de la bière, tandis que la plupart des autres bactéries la troublent, a un intérêt pratique.

De nombreuses recherches de l'auteur du présent ouvrage ont prouvé que, dans les distilleries et principalement dans les fabriques de levure pressée, les bactéries acétiques étaient très répandues, le plus souvent accompagnées d'espèces de *Mycoderma*. Un contrôle soigneux de la fabrication doit donc toujours être fait dans ce sens.

En étudiant l'action des acides, surtout de l'acide acétique, sur les levures de vin, Lafar trouva, qu'à chacun des différents acides (acides malique, tartrique, lactique, acétique, etc.) il revient une influence propre, tant sous le rapport des relations de poids entre l'alcool et l'acide carbonique que de la quantité de glycérine ; les échantillons provenant de l'acide acétique montrèrent les plus petites quantités de glycérine et la plus faible multiplication de levure. En opposition aux anciennes assertions que de très petites quantités d'acide acétique pouvaient déjà empêcher la fermentation alcoolique, l'observateur mentionné trouva qu'en présence de 0,27 0/0 de cet acide, on ne pouvait encore observer aucun ralentissement sensible ni dans le cours de la fermentation, ni dans la multiplication des cellules, ni dans le rendement en alcool et en glycérine. Dans du moût de raisin non désacidifié, les cellules de levure supportèrent encore une addition de 0,74 0/0 ; dans du moût désacidifié, après addition de 1 0/0 d'acide acétique, il se forma encore 4,77 0/0 en volume d'alcool, c'est-à-dire 60 0/0 du maximum de la quantité. — Mais les levures sont différemment sensibles à l'action de l'acide acétique. — En comparant 15 races différentes de levures de vin, on observa, qu'en présence de 0,8 0/0 d'acide acétique dans du moût préalablement désacidifié, toutes pouvaient continuer la fermentation, tandis qu'a-

vec 1 0/0 d'acide il n'y eut que 3 races qui en étaient capables. Pour ce qui concerne la multiplication des cellules les levures se montrèrent très différentes en présence de la même quantité d'acide acétique. Lafar étudia aussi l'influence de cet acide sur le travail chimique, c'est-à-dire sur les relations existant entre la quantité produite d'alcool et le nombre des cellules de levure formées. Dans 10 races il trouva que le travail fourni par une cellule était plus grand, par contre dans 2 races plus petit en présence de 0,88 0/0, qu'avec 0,78 0/0 d'acide acétique. Les cellules qui pouvaient encore agir en présence de 1 0/0, montrèrent dans ces conditions, moins d'activité qu'avec 0.88 0/0 d'acide.

2. — Bactéries lactiques

Si l'on expose du lait à une température de 35-42° C., il deviendra bientôt aigre, et une grande partie de l'acide qui se forme se trouvera être de l'acide lactique, produit par l'action de différentes espèces de bactéries. Quand il s'est formé une certaine quantité d'acide lactique, la fermentation cesse. Elle recommence lorsqu'on neutralise le liquide avec du carbonate de chaux, ou par l'addition d'une petite quantité de pepsine ou de pancréatine, qui ont pour effet de dissoudre la caséine du lait.

Pour la mise en train d'une fermentation lactique spontanée, on emploie par exemple le procédé suivant : on ajoute à un litre d'eau, 100 grammes de sucre, 10 grammes de caséine ou de vieux fromage et une quantité abondante de carbonate de chaux pulvérisé. Ce mélange est versé dans un vase ouvert et exposé à une température de 35 à 40° C. On agite de temps à autre le liquide ou bien on y fait passer un courant d'air. La fermenta-

tion achevée, on fait évaporer le liquide et il reste du lactate de chaux cristallisé, dont on extrait l'acide lactique en ajoutant de l'acide sulfurique.

Outre la lactose, quelques bactéries lactiques peuvent aussi faire fermenter le sucre de canne, la glucose, la maltose et diverses autres substances. D'après les expériences de *Bourquelot*, il y a une espèce de bactérie lactique qui se présente dans la fermentation acide spontanée du lait, pouvant faire fermenter le sucre de canne sans inversion préalable.

Ces bactéries sont relativement assez rares dans la nature, mais fréquentes dans les divers locaux de fermentation.

Dans la brasserie, la fermentation lactique se manifeste déjà dans le malt et surtout pendant le brassage, puis pendant la fermentation ; dans les bières belges, fabriquées par « fermentation spontanée » l'acide lactique se forme en grande quantité, ce qui donne aux bières un goût âcre. C'est à une vigoureuse fermentation lactique que les bières à fermentation haute appelées « bières blanches » doivent leur goût rafraîchissant. Dans les brasseries modernes, à fermentation basse, on cherche à tenir éloignées de la fermentation, tant les bactéries lactiques que toutes les bactéries en général.

Dans les distilleries, on cultive par contre méthodiquement les bactéries lactiques dans le but de réprimer directement les bactéries, mais surtout les bactéries butyriques, ou du moins de leur préparer un champ de développement aussi défavorable que possible. Nous reviendrons plus loin sur ce sujet.

On trouve parfois des bactéries lactiques dans la fermentation du vin, où elles provoquent des maladies, mais probablement plus facilement quand la composition du moût est loin d'être normale. Elles occasionnent de forts troubles, accompagnés d'altérations de couleur et de

goût. *Müller-Thurgau* a isolé d'un vin contaminé un bacille qui, ensemené dans du moût, provoque une fermentation lactique.

Le premier ouvrage important sur les ferments lactiques est dû à *Pasteur* (1858), qui décrit l'espèce de bactérie lactique qui se produit lorsque le lait entre spontanément en fermentation. Dans ses « *Etudes sur la bière* » il a donné un dessin des bactéries qui se développent dans le moût et la bière entrés en fermentation lactique (Fig 19) ; il les décrit comme de petits bâtonnets légèrement étranglés au milieu, généralement isolés et ne formant que rarement des chaînes.

En 1877, *Lister* fit une culture pure d'une bactérie lactique, retirée du lait aigri, à laquelle il donna le nom de *Bacterium lactis*.

Plus tard, en 1884, *Hueppe* trouva dans une fermentation lactique spontanée, une bactérie qui convertit la lactose et d'autres saccharates en acide lactique avec formation simultanée d'acide carbonique (*Bacillus acidi lactici*). Elle consiste en cellules courtes, épaisses, immobiles, qui sont au moins la moitié plus longues que larges,

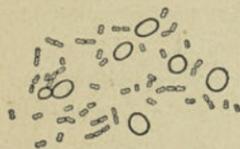


FIG. 19.

Bactéries lactiques d'après *Pasteur*. Pour donner une idée de la grosseur des bactéries, quelques cellules de levure ont été dessinées dans la figure.

et qui sont accolées deux à deux et, plus rarement quatre à quatre. Dans des solutions sucrées et moins clairement dans le lait, elles forment des spores qui apparaissent en globules brillants aux extrémités des bacilles. Dans les plaques de gélatine, elles forment des colonies blanchâtres qui, tant qu'elles se trouvent à l'intérieur

de la masse, sont rondes, uniformément foncées, aux contours nettement dessinés ; lorsqu'elles se trouvent

à la surface, elles ont une bordure plus claire. Pour la fermentation au moyen de cette espèce, l'oxygène de l'air est de rigueur. Elle fait coaguler la caséine du lait.

Dans la littérature moderne, on trouve la description d'un grand nombre de bactéries lactiques. On en trouve par exemple deux espèces (microcoques) dans la salive et dans le mucus des dents. Parmi les espèces formant le pigment, il s'en trouve aussi qui, en dehors de leur fermentation pigmentaire, sont capables de produire de la lactose assez d'acide lactique pour faire coaguler la caséine du lait. Ici se rangent en outre, d'après *Hueppe*, le célèbre *Micrococcus prodigiosus*, et d'après *Krause*, une forme pathogénique, le micrococcus de l'ostéomyélite, qui appartiennent à ces espèces.

D'après les indications de *Delbrück*, *Zopf* obtint une bactérie lactique en exposant pendant quelque temps un mélange de 200 grammes de malt et de 1000 grammes d'eau à la température de 50° C. Onensemencit par ce liquide une solution de lactose, à la surface de laquelle le champignon formait bientôt un voile. Les filaments se composent d'abord de bâtonnets; plus tard, on peut observer à ces mêmes filaments des bâtonnets et des coques.

Dans le levain acide de boulangerie, *Peters* trouva une bactérie qui provoqua une fermentation lactique prononcée. Dans les cultures sur plaques, elle forme des colonies rondes à couches concentriques. Les bâtonnets montrent une mobilité vive comme dans un essaim. Sur une solution sucrée neutre d'eau de levure, cette espèce forme, au bout de quelque temps, à 30° C., un voile visqueux; ici les bâtonnets se sont prolongés en longs filaments. On n'observa pas une formation de spores.

Le *Pediococcus acidi lactici*, analysé par *Lindner*, donne, lorsqu'il est cultivé à 41° C. dans une solution

neutre d'extrait de malt, une réaction fortement acide ; dans une solution non stérilisée de ladite espèce, ainsi que dans une décoction de foin non stérilisée, cette bactérie se développe à la température indiquée, d'après Lindner, tellement vigoureusement, que tous les autres organismes sont arrêtés dans leur reproduction. Par voie chimique, on constata que la majeure partie de l'acide qui s'était formé en abondance était de l'acide lactique. Quand une infusion de malt d'orge ou de malt de seigle est tenue à 41° C. cette espèce se développe fortement, et les bâtonnets lactiques se retirent. Dans une solution neutre d'extrait de malt, le *Pediococcus* soumis à 62° C. est tué en cinq minutes. Sur des gélatines, il ne se développe que difficilement ; ce n'est qu'en culture par piqûre dans de l'extrait de malt gélatiné, qu'il forme, à l'intérieur de la masse, de très vigoureuses colonies de couleur blanche. Il paraît, du reste, mieux croître à l'abri de l'air que sous son influence.

Le *Saccharobacillus Pastorianus* décrit par van Laer qui apparaît sous forme de filaments de différentes longueurs, cause dans la bière une maladie particulière (bière tournée), laquelle se manifeste de la façon suivante : le liquide perd peu à peu son éclat ; si on l'agite, les filaments soyeux se détachent du fond et en même temps la bière acquiert une odeur et un goût désagréables. Dans les cultures, le bacille se développe aussi bien en présence de l'oxygène libre qu'en son absence. Dans les milieux nutritifs, il fermente les hydrates de carbone. La saccharose est fermentée sans intervention préalable. Les produits de la fermentation sont, entre autres, l'acide lactique, l'acide acétique et l'alcool. Les acides formés déterminent dans la liqueur un précipité de matières azotées qui, mélangées au bacille, forment ces nuages composés de filaments soyeux, dont nous avons parlé.

Pour les cultures de cette bactérie, une infusion de malt additionnée d'agar et d'un peu d'alcool se prête le mieux.

Récemment, *Grotensfelt* décrivit des espèces qui doivent bien être considérées comme nouvelles; il ne réussit pas à les identifier avec celles qui furent décrites par *Hueppe* et *Marpmann*. Chez quelques-unes, on observa qu'elles décomposaient le sucre en alcool, à côté de l'acide lactique qui se dégage. Il supposa qu'elles participent à la formation de l'arôme dans le beurre.

M. E. Kayser a fait des recherches étendues sur les relations chimiques dans les fermentations lactiques, en se servant de cultures pures de végétations dans du lait, dans de la crème, dans de la bière, dans du moût de raisin, etc. On savait déjà avant que la quantité d'acide formé variait suivant les différentes espèces, de même que les proportions entre acides volatils et fixes. Ceci a été constaté par *M. Kayser*. Des végétations de la même espèce, cultivées à la surface du liquide, donnèrent plus d'acides volatils que les cultures développées au fond.

Encouragé par le succès qui a été atteint dans les industries de la fermentation, par l'introduction du système de culture pure de *Hansen*, on a commencé, depuis quelques années, à utiliser ce même principe dans les laiteries et, pour le procès de l'acidification, dans les distilleries. Nous indiquons ici brièvement l'état actuel de ce développement.

Dans les distilleries, où la température des trempes ne dépasse jamais environ 70°, parce que l'on veut ménager la diastase, un grand nombre de germes adhérant aux matières premières, ne sont pas tués et peuvent se développer pendant la fermentation, où elles pourront, soit épuiser les matières nutritives, ou enrayer la fermentation alcoolique désirée; sous ce rapport, les bactéries butyriques sont surtout à craindre. Pour éviter la pullu-

lation des germes nuisibles à la levure, on a ajouté directement aux trempes différents acides, ou bien on a provoqué dans une petite partie, formant environ le dixième du mélange de malt et d'eau, une fermentation lactique, en maintenant la masse totale à environ 50°, jusqu'à ce qu'elle montrât environ 2° 1/2 d'acide, ce qui veut dire que pour neutraliser 20 c. c. du mélange il faut 2 c. c. 1/2 d'alcali-normal, ce qui correspond à peu près à 1 0/0 d'acide lactique. La température indiquée est la plus favorable à ces espèces utiles de bactéries lactiques. Puis on chauffe à 70°, pour tuer une partie de ces bactéries, on refroidit à environ 20° et on ajoute la levure. Celle-ci n'est ordinairement pas attaquée par la quantité mentionnée d'acide lactique. Quand la levure a atteint le développement voulu, on emploie ce mélange pour la mise en levain de la masse principale, après avoir préalablement mis de côté environ la dixième partie du levain, pour faire fermenter le mélange acidifié suivant.

L'acide introduit de cette manière dans la masse principale et les bactéries lactiques survivantes jouent donc le rôle de désinfectants et exercent en même temps une influence sur les cellules de levure, en partie directe, en partie par leur action sur les matières nutritives.

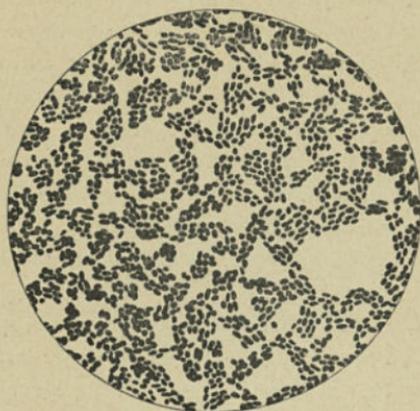
Si le procès décrit ici ne se fait pas tout à fait régulièrement, le rendement en souffrira, et souvent on a pu observer que des ferments étrangers s'étaient introduits. Ceci arrive surtout fréquemment au début d'une campagne, après la mort de la plupart des bactéries lactiques qui se trouvaient dans le local de fermentation. On a cherché à obvier à cet inconvénient en isolant d'un mélange de malt et d'eau acidifié, ayant toutes les apparences d'une bonne acidification normale, l'espèce de bactérie présente, afin de la développer en culture en masse et de l'introduire dans le nouveau mélange à acidifier. Ainsi *Lafar* développa du mélange acide, dans une distillerie, une

bactérie qui se distingue des espèces actives dans l'acidification du lait, à laquelle il donne le nom de *Bacillus acidificans longissimus*, parce qu'elle se présente avec des filaments souvent très longs. Les essais pratiques effectués jusqu'à présent par *Behrens* et *Lafar* avec des cultures pures de cette espèce, ont donné de bons résultats. *Leichnam* et d'autres chercheurs ont également développé des cultures pures de bactéries lactiques, trouvées dans le moût des distilleries. On ne sait pas encore jusqu'à présent si l'acidification spontanée est due à une seule espèce toujours prédominante, ou si plusieurs espèces sont en jeu.

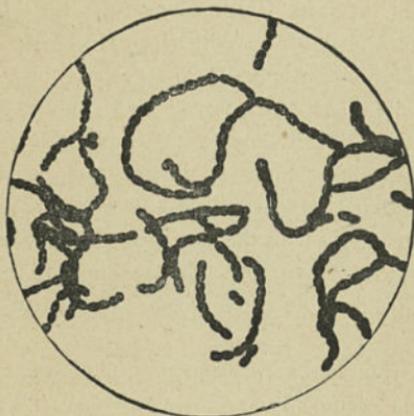
Déjà depuis 1890, on fait dans les *laiteries*, un emploi analogue d'espèces de bactéries sélectionnées, pour obtenir une *acidification* sûre et constante de la *crème* servant à la fabrication du beurre. Les progrès atteints dans ce domaine, se rattachent aux recherches de *Storch*, *Weigmann*, *Qvist*, etc. On ajoute la culture pure choisie à du lait écrémé, préalablement chauffé à 60°, puis on la laisse se développer à 15°. Au bout de 24 heures on peut employer ce mélange acidifiant. Pour rendre la crème qui doit êtreensemencée, aussi pauvre en germes que possible, on la refroidit d'abord fortement, puis on élève rapidement la température à environ 20°, ou bien, on la pasteurise. Dans l'espace de 24 heures on laisse se développer la première culture dans la crème, puis le barattage commence.

Parmi les formes que *Storch*, à Copenhague, isola, en 1890, du beurre, de la crème aigrie et du petit-lait, c'est la forme des coccus qui, d'après *Weigmann*, serait la plus fréquente et la plus propice à l'acidification de la crème. Elle apparaît avec un grand nombre de variétés, qui suivent deux directions principales, en donnant soit un produit ressortant par la finesse de son arôme et par son goût pur et agréablement acidulé, soit un produit doué d'une

grande conservabilité. Au point de vue morphologique, les végétations se distinguent en ce que quelques-unes



a



b

FIG. 20.

Bactéries lactiques d'après *Storch*.

présentent le plus souvent et sont les plus répandues. Ces formes ont une certaine ressemblance avec le « ferment lactique » de *Pasteur*. La forme dessinée dans la fig. 20 (a), a été trouvée par *Storch* dans un échantillon de beurre pur et très aromatique. Sur gélatine, elle forme des petites colonies sphériques toutes blanches, à surface unie. Dans le lait et dans le petit-lait, elle se présente avec des formes ovales et sphériques. Les bactéries lactiques que nous venons de mentionner, manifestent déjà à 20° C. une activité fermentative énergique.

Une espèce qui fut employée pratiquement dans plusieurs endroits, avec beaucoup de succès, a été obtenue par *Qvist*. Celle-ci se présente comme microcoque ou sous d'autres formes, selon les divers milieux dans lesquels elle est cultivée. Sur la gélatine, elle forme de petites colonies toutes rondes, croissant lentement, de couleur jaune pâle. Dans les cultures par pipûre, il naît une série de colonies globulaires, et dans les cultures par stries, elle forme une ligne continue avec des bords ondulés. Elle fut isolée d'un échantillon de beurre qui possédait à un degré tout particulier de l'arome et la faculté de se conserver.

D'autre part, on trouva dans les dernières années, une série d'espèces de bactéries qui provoquent des maladies dans le lait et dans le beurre. Ainsi *Schmidt-Mülheim* trouva un microcoque qui se présente en chaînes formant des chapelets et qui rend le lait visqueux. Une espèce possédant la même propriété et qui provoque en même temps une vigoureuse fermentation lactique, fut trouvée par *Ratz*. D'autres de ces espèces visqueuses ont été décrites par *Adametz*, *Duclaux* (*Actinobacter*), *Guillebeau*, *Löffler*, *Storch* et *Leichmann*. *Weigmann* prépara entre autres, une culture pure d'une certaine espèce qui donne au lait un goût amer et qui secrète un ferment dissolvant, la caséine. *Jensen* trouva également des espèces qui provoquent dans le lait et le beurre des changements de goût très anormaux, parmi ceux-ci surtout le *Bacillus fetidus lactis* qui se présente en bâtonnets épais, mobiles, de différentes longueurs, tenant en partie du microcoque. *Storch* a prouvé que le repoussant goût de suif du beurre provenait d'une forme de bactérie acidifiant et coagulant le lait.

La coagulation du lait dans la fabrication du fromage, où la caséine est précipitée, est, comme on sait, obtenue industriellement par la présure, un enzym, secrétée

par certaines glandes gastriques de divers animaux. On trouve ce même ferment dans plusieurs plantes, par exemple dans *Pinguicula*, *Ficus carica*, et, ces dernières années, on l'a aussi constaté dans quelques bactéries. Ainsi *Conn* a, en 1892, développé des cultures pures de ces bactéries. C'est surtout parmi les « bacilles de la pomme de terre » que l'on trouve des bactéries de cette espèce. Leur enzym diffère cependant, sous certains rapports, de celui de la présure. Le *Micrococcus prodigiosus*, si souvent mentionné, et le *Bacterium coli communis*, toujours présent dans l'intestin de l'homme et des animaux, possèdent le même euzyme.

Les bactéries actives dans la *maturation du fromage* et d'autres champignons ont été étudiées, entre autres, par *Adam-tz*, *Duclaux*, *Freudenreich* et *Weigmann*. Parmi ces champignons qui ont en partie une action peptonifiante sur la caséine, il en existe beaucoup qui peuvent exercer une certaine influence dans la maturation du fromage, lorsqu'ils se trouvent en nombre suffisant, soit en lui imprimant une direction spéciale, soit en produisant des arômes individuels aux diverses espèces de fromage.

3. — Bactéries butyriques.

Lorsque l'on a laissé reposer du lait pendant quelque temps et qu'il a montré un développement de bactéries lactiques, et que l'on a en même temps neutralisé l'acide en additionnant de la chaux (craie), de manière à former du lactate de chaux, il se produit généralement une fermentation butyrique. *Pasteur* a démontré, en 1861, que cette fermentation était provoquée par des microorganismes

mes particuliers pouvant vivre sans air (*vibrions butyriques*). La fermentation butyrique spontanée a sa plus grande activité entre 33-40° C. L'amidon, la dextrine, le sucre de canne et la dextrose fournissent un milieu pour des fermentations butyriques, et celles-ci se produisent très facilement parce que les différentes bactéries de ce groupe sont très répandues dans la nature. Ce sont sans doute aussi des espèces voisines qui jouent un rôle dans la maturation du fromage mentionnée plus haut. Pour produire une fermentation butyrique, *Fitz* recommande de mélanger 2 litres d'eau avec 100 grammes de fécule de pommes de terre ou de dextrine, 1 gramme de sel ammoniac et les sels nutritifs ordinaires; le tout avec 50 grammes de craie, et de maintenir ce mélange à 40° C. *Bourquelot* recommande d'exposer de l'eau et des tranches de pommes de terre crues pendant quelques jours à 25-30° C. A 35° C. la fermentation spontanée paraît être encore plus active.

Les principaux produits de la fermentation butyrique sont l'acide butyrique, l'acide carbonique et l'hydrogène.

Dans la trempé sucrée des brasseries, distilleries et fabriques de levure pressée, il se présente toujours des espèces de bactéries butyriques qui peuvent, si les trempes sont maintenues pendant longtemps à de certaines températures, se développer fortement et exercer une action nuisible sur les ferments alcooliques. Lorsqu'il se trouve dans la bière de l'acide butyrique en quantité sensible, elle prend un goût très désagréable.

D'après les recherches de Pasteur, le ferment butyrique peut, comme il a été dit plus haut, exercer son action fermentative sans oxygène libre. Les fermentations butyriques spontanées ordinaires sont le plus actives lorsque l'oxygène n'a pas accès. Des recherches ultérieures ont cependant démontré qu'il existe beaucoup de bactéries butyriques qui, non seulement donnent des produits de

fermentation différents, mais qui se comportent aussi différemment à l'égard de l'oxygène libre. Quelques-unes ne peuvent pas se développer tant que ce dernier est là — espèces anaérobies — tandis que d'autres, au contraire, se multiplient et provoquent des fermentations butyriques lorsqu'on donne accès à l'oxygène — espèces aérobies. (1)

Une des premières espèces décrites d'une manière exacte est le *Clostridium butyricum* (*Bacillus butyricus*) de Prazmowski (Fig. 21). Elle se présente sous la forme de filaments et bâtonnets courts et longs qui peuvent être droits ou légèrement recourbés. Les bâtonnets sont animés d'une grande mobilité et paraissent à un fort grossissement munis d'un grand nombre de cils.

Avant la formation des spores dans les bâtonnets, ceux-ci se gonflent et prennent comme le montre la figure

(1) La culture pure des bactéries anaérobies se fait par exemple dans des gélatines nutritives ou de l'agar, dans des éprouvettes presque remplies, où ces bactéries peuvent se développer dans les couches profondes du milieu. Un meilleur procédé consiste à faire le vide dans l'éprouvette, pendant qu'on la maintient dans de l'eau à 30°-35° C., puis on la bouche hermétiquement ou on la ferme à la flamme. On peut aussi faire barboter un courant d'hydrogène dans le milieu liquide contenant la végétation ; dès que l'air atmosphérique est sorti, on ferme hermétiquement et on roule le tube d'essai jusqu'à ce que la gélatine soit refroidie et forme une couche solide sur la paroi intérieure du tube, dans laquelle apparaissent peu à peu les colonies. On peut aussi employer à la culture une substance très avide d'oxygène, par exemple l'acide pyrogallique (1 gramme d'acide pyrogallique dans 10 c.c. de solution de potasse caustique à 10 0/0), en plaçant l'éprouvette ouverte ou la plaque de culture dans une éprouvette ou autre vase hermétique renfermant la solution indiquée ; ou bien on recouvre les cultures d'une couche de paraffine, de vaseline, d'huile, ou avec des lames de mica, etc. — En ajoutant aux substances nutritives de la glucose ou de petites quantités de formiates ou de sulfoindigotate de sodium, on rend le milieu particulièrement favorable à ces bactéries.

des formes particulières ayant l'apparence d'un fuseau, d'un citron, d'un ellipsoïde ou d'une massue. En même temps les bâtonnets sont colorés en bleu par l'iode. Pendant la germination de la spore, son enveloppe extérieure se fend et le fil germinatif croît dans la même direction de l'axe longitudinal de la spore. Le *Clostridium butyricum* se développe le plus vigoureusement à une température d'environ 40° C., et il pourra prédominer dans des liquides sucrés surtout quand le ferment lactique aura déjà antérieurement converti une partie du sucre en acide lactique. Cette espèce est éminemment anaérobie.

Fitz a fait la description d'une

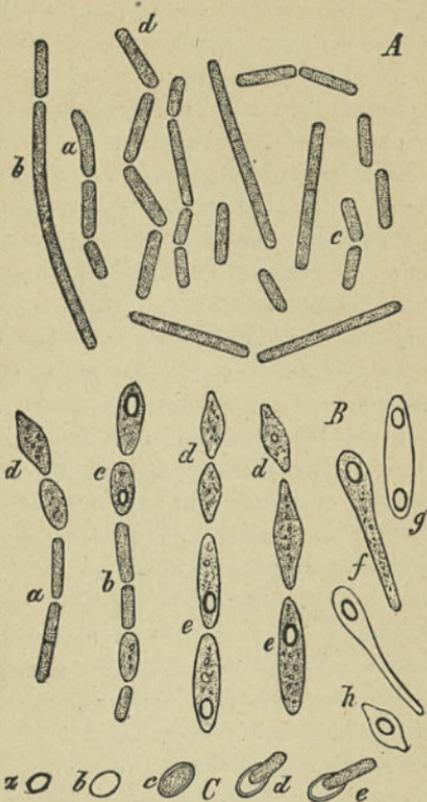


FIG. 21.

Clostridium butyricum Prazmowski, d'après Prazmowski. A Etats végétatifs, c bâtonnets courts, d bâtonnets longs, a et b bâtonnets et filaments recourbés à l'instar des vibriens. B Formation des spores durables; b, d bâtonnets avant, c, e pendant, f, g, h, après la formation des spores durables; c bâtonnets à forme ellipsoïdale, d et h forme de citron, e et g forme de fuseau, f forme de têtard, a bâtonnets se trouvant encore à l'état végétatif. C Germination des spores durables; la spore a se gonfle en b, c montre alors la différenciation de la membrane en exo — et endospore. Par l'extrémité polaire fendue de la spore, le contenu entouré de l'endospore se dégage sous la forme d'un bâtonnet court d, qui s'est déjà allongé en e.

espèce appartenant aux formes *aérobies*. C'est un court bacille cylindrique, que l'iode ne colore pas en bleu, qui manifeste un mouvement spontané modéré et qui ne forme pas de spores. Il fait fermenter tous les hydrates de carbone, excepté la fécule et la cellulose.

Hueppe aussi a décrit une espèce qui fut trouvée dans le lait et qui offre les mêmes propriétés que celle de *Prazmowsky*, mais qui s'est montrée moins sensible envers l'oxygène et qui doit, par conséquent, être rangée parmi les espèces *aérobies*.

Gruber trouva associées sous le nom de *Clostridium butyricum*, trois espèces bien distinctes, dont deux exclusivement anaérobies. La première de ces deux espèces développe des bâtonnets droits ou légèrement recourbés qui, durant la sporulation, prennent des formes de fuseau ou de baril ; elles forment, sur de la gélatine nutritive, des colonies qui, lorsqu'on les regarde par transparence, paraissent brun foncé ou même noir. La seconde espèce se compose de bâtonnets végétatifs fortement recourbés, portant les spores à leur extrémité : elles développent des colonies variant du jaunâtre au jaune-brun. La troisième espèce est, il est vrai, aussi capable de croître et de provoquer la fermentation, même à l'abri de l'oxygène : mais son développement se trouve sans contredit favorisé par la présence de l'oxygène, et ce n'est qu'alors qu'elle est à même de produire des spores. Les bâtonnets végétatifs sont cylindriques ; avec la formation des spores, ils prennent la forme d'un fuseau au centre duquel se développe la grande spore. Les colonies sur de la gélatine nutritive sont de couleur jaunâtre. Toutes ces trois espèces décomposent les hydrates de carbone en acide butyrique et en alcool butylique.

Une espèce très intéressante de bactérie butyrique est le *Clostridium Pasteurianum* qui a été étudiée par *Winogradsky* et qui possède la faculté d'absorber directe-

ment, en se l'assimilant, l'azote atmosphérique, tandis que l'azote en combinaison ne peut servir à la nutrition de cette bactérie.

Dans du lait insuffisamment stérilisé *Baier* et *Weigmann* rencontrèrent deux bactéries butyriques, dont l'optimum se trouve à 30° C., et qui ne sont pas essentiellement aérobies. Elles dissolvent la caséine au bout de quelques jours et produisent dans le liquide une odeur infecte et putride.

D'après *Fitz*, les spores des bactéries butyriques peuvent supporter la température d'ébullition pendant un espace de temps qui dépend, ici comme ailleurs, de l'état dans lequel elles se trouvent et de la nature du milieu nourricier. *Fitz* fixe 3-20 minutes comme limites. Ces spores peuvent cependant aussi être détruites à une température moins élevée si l'on a soin d'entretenir celle-ci suffisamment longtemps. Ainsi, elles sont tuées quand on les chauffe pendant six heures à 90° dans une solution de glucose; dans de la glycérine, à la même température, seulement au bout de 6 à 11 heures.

La fermentation butyrique, comme la fermentation lactique, n'est donc pas provoquée exclusivement par *une seule* espèce. Quand la fermentation butyrique se produit dans des distilleries, brasseries ou fabriques de levure pressée, on sera souvent en présence de bactéries différant complètement de celles qui ont été décrites plus haut.

Le *Clostridium butyricum* et plusieurs autres espèces sont capables de dissoudre la cellulose, et jouent par cela un rôle important dans la fermentation de la cellulose que l'on utilise dans diverses branches de l'industrie.

Une bactérie, pouvant aussi produire entre autres de l'acide butyrique, est le *Bacillus lupuliperda*, étudié par *Behrens*, très fréquent sur le houblon humide dont il provoque l'échauffement spontané. La végétation consiste

en coques mobiles et en bacilles courts qui liquéfient la gélatine. Dans un milieu exempt de sucre, ce microbe produit de grandes quantités d'ammoniaques composées, principalement de la triméthylaminé (odeur du sauris). En présence de sucre, le liquide nutritif devient rapidement acide et il se forme de l'acide butyrique. Cette espèce paraît avoir son habitat dans la terre et a beaucoup de ressemblance avec le *Bacillus fluorescens putridus* décrit par Flügge.

4. — Bactéries alcoogènes.

Beaucoup de bactéries ferment parmi les produits de leur fermentation aussi de l'alcool. La première espèce connue est le *Bacillus Fitzianus* (Fig. 22) trouvé par Fitz dans une infusion froide de foin, que H. Buchner a étudié plus tard exactement et qui apparaît sous forme de coques et de bacilles. Dans des solutions nutritives avec de la glycérine, celle-ci est fermentée par cette espèce et il se dégage principalement de l'alcool éthylique. Le *Bacillus ethaceticus*, découvert par P. Frankland, attaque la glycérine, la mannite et l'arabinose, en produisant aussi de l'alcool éthylique et de l'acide acétique. Ne citons enfin encore que le *Bacillus pneumoniae* de Friedlaender qui joint encore à ses propriétés pathogéniques la faculté de former, dans les liquides sucrés, entre autres de l'alcool éthylique et de l'acide acétique.

Comme nous l'avons déjà indiqué, on rencontre aussi de l'alcool butylique dans les produits de fermentation des trois espèces de bactéries butyriques décrites par Gruber. Beijerinck réunit les bactéries de la fermentation butylique sous le nom de *Granulobacter*, parce qu'en l'absence

d'oxygène elles produisent de la granulose et se colorent en

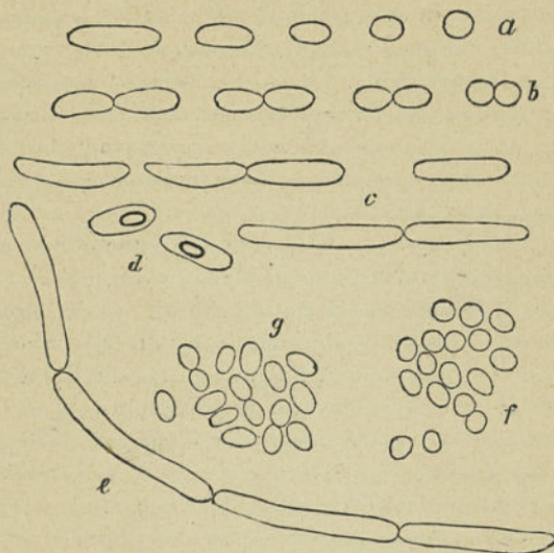


FIG. 22.

Bacillus Fitzianus d'après *H. Buchner*.

a, b, f, g formes de coques et bâtonnets courts ; **c, e**, bâtonnets longs ;
d bâtonnets avec spores.

bleu par l'iode. Les espèces décrites par l'auteur cité sont probablement identiques avec les bactéries butyriques de *Prazmowski, Fitz et Gruber*, dont nous avons fait mention

5. — Organismes du Képhir.

Le *Képhir*, sur lequel *Kern* nous a d'abord renseigné exactement, désigne un lait mousseux, alcoolique, acide, que les habitants du Caucase préparent avec du lait de vache, de chèvre ou de brebis. On le fait en ajoutant au lait un ferment particulier, les grains de Képhir. Ce sont

des grains inégaux, blancs ou jaunâtres, de forme irrégulière, atteignant la grosseur d'une noix, de consistance tenace et gélatineuse, et qui, en séchant, deviennent cartilagineux et cassants. La majeure partie de la masse de ces grains consiste en bactéries en bâtonnets, qui sont reliées pour former des filaments après avoir développé des membranes visqueuses. Kern nomme cette bactérie *Dispora caucasica*.

Suivant *Beijerinck* cette espèce provoque directement une fermentation lactique dans la lactose, le sucre de canne, la glucose et la maltose. Outre les bactéries, on rencontre dans les grains de Képhir diverses levures et souvent des moisissures. La préparation du képhir consiste à verser un peu de lait sur les grains, qu'on laisse ensuite reposer pendant 24 heures, à environ 17° C., après quoi on transvase le lait en conservant les grains qui resservent plus tard. Ce lait se mélange alors avec du lait frais : on le met en bouteilles que l'on bouche, ou dans des sacs en cuir bien fermés ; la fermentation se termine en 2 ou 3 jours, pendant lesquels on remue souvent le liquide. Il contient à ce moment jusqu'à 2 0/0 d'alcool. Ce résultat est sans doute dû à l'action simultanée de la *Dispora caucasica* mentionnée plus haut et des cellules de levure combinées aux bactéries lactiques, qui se trouvent toujours dans le lait. Ces dernières convertissent une partie de la lactose en acide lactique ; l'alcool et une partie de l'acide carbonique proviennent des cellules de levure. Comme le lait fermenté contient, suivant plusieurs auteurs, moins de caséine coagulée que le lait caillé ordinaire, on peut de plus admettre que la *Dispora* est aussi à même de liquéfier (peptoniser) en partie la caséine coagulée, peut-être précisément à l'aide de cette masse gélatineuse qu'elle secrète et qui se trouve dans les grains de képhir, tandis qu'elle ne se présente pas dans le lait fermentant.

D'après les récentes recherches de *Hammarsten*, la quantité de caséine ne paraît cependant pas diminuer ; seulement une partie de la caséine subit certaines modifications, aussi au point de vue physique, ce qui rend ses flocons plus fins. Ces contrastes proviennent peut-être des variations que l'on rencontre dans la composition biologique des grains de képhir.

Dans une série d'échantillons de képhir, *Freudenreich* trouva constamment la *Dispora caucasica* mentionnée plus haut, qui se développe surtout sur des plaques d'agar mêlé avec du lait et dans du bouillon au sucre de lait, à 35° ; les bacilles sont souvent munis de points brillants à leurs extrémités, et l'auteur cité suppose que ce phénomène coïncide avec les éléments pris par *Kern* pour des spores. Des spores distinctes ne furent d'ailleurs jamais observées. Dans tous les échantillons, on trouva toujours encore deux formes de coques lactiques et une espèce de levure. L'un des coques (*Streptococcus a*) forme des diplocoques et des chaînes en produisant, sur de la gélatine au sucre de lait, de grandes colonies blanches, à bords fortement granuleux, la température la plus favorable au développement de cette espèce se trouve à environ 22°. Elle coagule le lait le plus facilement à 35°, et contribue essentiellement à lui donner le goût acidulé et l'aspect de flocons fins. L'autre coque (*Streptococcus b*), qui développe également des diplocoques et des chaînes, apparaît avec des colonies plus petites que celles de la forme a, mais croît très bien aux températures élevées, produit plus d'acide que a, ne coagule cependant pas le lait. Quand elle est associée au ferment du képhir etensemencée avec lui dans du bouillon de sucre de lait, la fermentation est plus énergique que lorsque les bactéries s'y trouvent seules ; c'est ce qui fait supposer à l'auteur que le *Streptococcus b* dédouble le sucre de lait, en rendant ainsi possible sa fer-

mentation par la levure du Képhir. La *levure du Képhir*, trouvée par *Freudenreich*, accuse une vigoureuse croissance et une faible fermentation dans le moût de bière, mais ne semble pas provoquer de fermentation dans du lait ou dans du bouillon de sucre de lait. La végétation consiste en cellules ovales ($3-5 \mu$ de longueur, $2-3 \mu$ de largeur); elle ne forme ni voiles ni spores; sa température optimale de développement est à 22° .

Dans quelques essais, *Freudenreich* réussit à obtenir un produit analogue au képhir, en inoculant dans du lait un mélange des 4 espèces mentionnées, et en versant, au bout de quelques jours, un peu de ce mélange acide, caillé, soigneusement et souvent agité, dans du lait stérilisé. Il en conclut que ces quatre espèces pouvaient, par leur symbiose, provoquer la fermentation képhirique. Une constitution (synthèse) des grains de Képhir par ces quatre espèces ne put être observée, et on n'est toujours pas fixé sur le rôle que joue la *Dispora caucasica* dans ce travail fermentaire, de même qu'il faut admettre comme probable, qu'outre les formes de coques décrites par *Freudenreich*, d'autres espèces de bactéries et de champignons bourgeonnants y prennent part. Citons surtout qu'au laboratoire de l'auteur de ce livre, on a constaté, dans des grains de Képhir russe, la présence d'un véritable *Saccharomyces*, faisant directement fermenter le sucre de lait, tandis que tous les auteurs précédents n'avaient trouvé, dans le Képhir, que des champignons bourgeonnants sans sporulation.

Dans certaines contrées de l'Amérique du Nord, on emploie à la fermentation de liquides sucrés un ferment ressemblant aux grains de Képhir. Suivant les recherches de *Mix*, il contiendrait une espèce de levure correspondant à celle qui a été décrite par *Beijerinck*, et une bactérie analogue à la *Dispora* de *Kern*.

Si on laisse un des grains de képhir dans du lait, il

croît très lentement et n'atteint, d'après les expériences de *de Bary*, que dans l'espace de quelques semaines le double de sa grosseur primitive. Cet auteur considère comme probable que dans ces conditions, quelques articles de la *Dispora* se séparent et donnent naissance à de nouveaux grains de Képhir. Suivant le procédé indiqué par *A. Lévy*, le Képhir peut être obtenu sans l'addition du ferment décrit par *Kern*. En agitant fortement et souvent du lait qui se caille, on obtient une boisson de Képhir mousseuse, alcoolique, dont le goût ne diffère pas sensiblement de celui préparé avec les grains.

Le ferment de la bière de gingembre, qui a quelque ressemblance morphologique avec le ferment du Képhir, a été étudié, tant au point de vue botanique, qu'au point de vue biologique, par *Marshall-Ward*. Lorsqu'on introduit ce ferment dans des solutions sucrées, additionnées de gingembre, on les transforme, par là, en une boisson acide, mousseuse: la bière de gingembre. A l'état frais, ce ferment se présente en masses solides, blanches, translucides, irrégulières, grumeleuses, cassantes comme de la gelée sèche, variant de la grosseur d'une tête d'épingle à celle d'une grosse prune. Elle provoque dans la solution sucrée une fermentation alcoolique et rend en même temps le liquide visqueux. *Marshall-Ward* isola les nombreux microorganismes se trouvant dans les corps décrits plus haut et donna des descriptions exactes d'une série de levures, de bactéries et de moisissures, parmi lesquelles se trouvèrent deux microorganismes, qui provoquaient principalement la fermentation de la bière de gingembre. L'un est un *Saccharomyces* appartenant au groupe des ellipsoïdes et provenant probablement du gingembre et du sucre brun employés dans la pratique. L'auteur lui a donné le nom de *Saccharomyces pyriformis*. Cette espèce intervertit le sucre de canne, provoque une fermentation alcoolique active dans les solutions de sucre

de canne interverti et forme dans les ballons un dépôt blanc et pâteux. Le champignon développe, au bout de 40 à 50 heures, à 25°, des spores sur des blocs de plâtre; il forme aussi des spores sur de la gélatine. Dans du moût houblonné, il provoque une fermentation médiocrement énergique et couvre la surface d'un voile; les cellules de ce voile ont ordinairement la forme d'une poire ou d'un boudin.

L'autre forme qui est toujours représentée et qui est essentiellement active dans la fermentation lactique, est un schizomycète, le *Bacterium vermiforme* qui, d'après la supposition de l'auteur, provient du gingembre. Ce champignon est un microorganisme ayant la forme bizarre d'un ver enfermé dans des gaines hyalines, gonflées, gélatineuses. Celles-ci contiennent les cellules de levure dans les masses parenchymateuses formées par les contours. Les gaines gonflées de cet organisme forment la masse principale du ferment. Cette espèce se présente également sans les gaines et avec toutes les différentes formes de végétations qu'on rencontre chez les bactéries. Les gaines gélatineuses ne sont formées que lorsque le liquide ne contient pas d'oxygène et lorsqu'il est acide.

D'autres organismes étaient toujours représentés par une espèce de *Mycoderma* et par le *Bacterium aceti*. On trouva aussi mélangé accidentellement un grand nombre de différentes bactéries et d'autres champignons.

La preuve que le *Saccharomyces pyriformis* et le *Bacterium vermiforme* étaient les deux seules espèces essentiellement actives dans la fermentation du gingembre, a été donnée par l'auteur au moyen d'expériences. Car ce n'est qu'en provoquant une fermentation avec ces deux espèces, qu'il put produire une action analogue à celle due à l'emploi du ferment ordinaire de la bière de gingembre. Mais ce n'est que lorsque ces deux espèces se développent simultanément dans le liquide, qu'elles produi-

sent ce résultat, et les expériences de l'auteur démontrent que les rapports entre la levure et la bactérie sont ceux d'une véritable vie en commun (*symbiose*), de sorte que les deux espèces forment un organisme composé qui produit une « fermentation symbiotique ».

6. — Bactéries visqueuses.

Parmi les différentes bactéries visqueuses, plusieurs espèces ont, pour l'industrie de la fermentation, un intérêt particulier, car elles se trouvent dans le vin et le moût en fermentation et produisent des altérations morbides dans ces liquides. Selon toute analogie, cette viscosité peut être considérée comme un phénomène étroitement lié à la formation des zoogléas (voir page 73), qui est générale chez les bactéries. Chez quelques espèces, on considère cependant la matière visqueuse comme un produit de la décomposition du sucre, c'est-à-dire comme ne faisant pas directement partie de l'organisme en question.

Dans les fermentations visqueuses étudiées par *Béchamp*, il se forme une espèce de dextrine, que cet auteur nomma *viscose*, ainsi que de l'acide carbonique et souvent en même temps de la mannite.

Dans ses « *Etudes sur la bière* », *Pasteur* décrit (Planche I, Fig. 4) des chapelets d'organismes sphériques qui rendent le vin, la bière et le moût filants.

Kramer nous a donné la description d'un *Bacillus viscosus sacchari* qui transforme rapidement une solution de sucre de canne en une masse gluante et glaireuse. Une autre espèce, rendant le jus de betterave *visqueux*, a été décrite par *Glaser* sous le nom de *Bacterium gelatinosum betæ*.

Cramer a isolé un *Bacillus viscosus vini*, qu'il cultiva à l'abri de l'air dans du vin stérilisé. Du vin sain, ensemencé avec cette végétation, devint visqueux au bout de 6 à 8 semaines. Cette espèce se développe le mieux entre 15 et 18° C. et semble déjà périr à 30° C.

Dans la bière blanche de Berlin devenue « filante », *Lindner* trouva un *Pediococcus* dans un fort développement. La maladie put être provoquée par l'infection du moût stérilisé de bière blanche avec des cultures pures de cette espèce. Par contre, cet organisme resta sans influence sur du moût houblonné ou sur des bières de fermentation basse.

Dans des bières *filantes* belges, *van Laer* trouva comme promoteurs de ladite maladie de petits bâtonnets très minces, ayant 1,6 à 2, 4 μ de longueur, isolés ou accolés deux à deux par une substance zoogléiforme intermédiaire. Inoculés dans du moût de bière, ces bâtonnets le troublaient d'abord, puis le rendaient filant. Sur du bouillon gélatinisé, ils produisent des colonies en anneaux concentriques de différentes couleurs avec un renforcement au milieu ; par des inoculations en stries, on obtient de larges bandes blanches à bords sinueux : par des cultures par piqûre, il se forme des trainées blanches qui s'étendent rapidement vers le fond du tube ; la gélatine se fend et la colonie envahit les cavités ainsi produites, en même temps qu'elle forme une tache très développée à la surface autour de la piqûre. Il est résulté des expériences faites avec des cultures pures de cette forme de bactérie dans du moût de bière, que sous cette même forme se trouvaient réunies plusieurs espèces produisant chacune un effet un peu différent sur le moût. Elles sont désignées collectivement sous le nom de *Bacillus viscosus*. Quand on infecte un moût stérilisé par cette bactérie et qu'on ajoute quelques heures après de la levure alcoolique, le liquide devient visqueux.

Lorsque le moût estensemencé avec un mélange de levure absolument pure et de bactéries, la maladie se déclare à différents degrés, suivant la quantité de bactéries mêlées à la levure. Si les bactéries ne sont ajoutées qu'après la fin de la fermentation principale, la maladie ne se montre pas. Plus le liquide est riche en matières azotées, plus la viscosité se produit rapidement. Même des liquides ne contenant pas de sucre peuvent être rendus filants par ces espèces. Dans les liquides nourriciers à haute teneur en sucre, ce champignon ne se développe que faiblement et n'apparaît pas dans des solutions uniquement sucrées.

Vandam trouva dans des bières anglaises, une espèce aérobic, le *Bacillus viscosus*, qui se présente sous forme de petits bâtonnets, isolés ou réunis en chaînes de deux, trois ou plusieurs membres, développant une spore en leur milieu. Ce bacille a sa meilleure température à environ 30° ; il produit dans du moût de bière une masse visqueuse que l'examen microscopique nous révèle comme formations de zooglées ; au bout de quelque temps, la viscosité augmente au point que le liquide prend la consistance de l'albumine. Il n'y a aucun dégagement de gaz ; mais le liquide prend une odeur particulière. Sur du bouillon de viande gélatiné additionné de sucre et sur du moût gélatiné, la végétation montre un vigoureux développement. La viscosité du liquide ne semble pas dépendre de la quantité de matières azotées. Pour pouvoir provoquer des maladies dans la bière, cette espèce doit se trouver en vigoureux développement et être transportée dans le moût avant ou en même temps que le levain. Comme les formes trouvées par *van Laer* cette dernière fait aussi fermenter le sucre de lait. D'après l'auteur, il serait facile d'en constater la présence même en quantité minime dans la levure ; il suffirait d'ensemencer une parcelle de cette levure dans un liquide nourricier à base

de lactose, et l'on verrait bientôt apparaître une végétation de cette espèce dans les couches supérieures du liquide.

Brown et *Morris* mentionnent aussi une forme de coccus, qui semble provoquer une fermentation visqueuse (ropiness) dans les bières anglaises. Cette espèce se présente sous forme de diplocoques et de tétrades et développe, sur du bouillon de viande gélatiné, des colonies jaunes, céracées. La maladie se déclarait dans la bière au bout de 6 à 8 semaines ; mais elle ne peut ordinairement être provoquée par ensemencement d'une culture pure de cette espèce dans de la bière stérile. Dans le voisinage des locaux de fermentation se trouvait une charcuterie, où des matières en putréfaction étaient amassées : après qu'elle eût été éloignée et que le sol eût été creusé et nettoyé, la maladie de la bière disparut complètement.

Fellowes analysa de même diverses bières anglaises contaminées, dont il cultiva les bactéries, mais il ne réussit non plus, par l'ensemencement de ces cultures pures, à produire une bière renfermant ces organismes et montrant une viscosité analogue à celle de l'échantillon dont la culture avait été retirée.

La bactérie de la gomme de sucrerie, « *frai de grenouilles* » (*Leuconostoc mesenterioïdes*) (Fig. 23), a été étudiée par *Cienkowski* et *van Tieghem* et plus tard par *Zopf* et *Liesenberg*. La forme répandue en Europe aussi bien que la variété trouvée par *Winter*, à Java, se développent spontanément dans le jus de betteraves et dans la mélasse des sucreries, où elles forment de gros grumeaux visqueux (gomme de sucrerie). Ces organismes se multiplient fortement et ils forment des chaînes de coques accouplés deux à deux. Contrairement à des observations antérieures, *Zopf* trouva qu'il n'existe aucune différence, tant au point de vue morphologique qu'au

point de vue physiologique, entre ces coques. Une sporulation ne peut en général pas du tout se constater. Ainsi

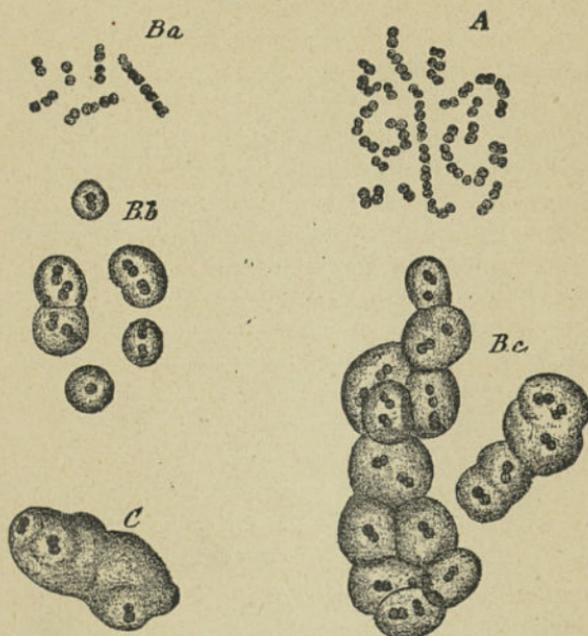


FIG. 23.

Leuconostoc mesenterioïdes Cienkowski d'après Zopf.

- A Couples de cellules de la variété sans enveloppe, prise d'une culture sur pommes de terre ;
 B Phases de développement provenant d'une culture sur gélatine non sucrée : **Ba** sans enveloppe gélatineuse ; **Bb** la même après 24 heures de culture dans une solution de mélasse ; les enveloppes gélatineuses existent déjà, mais elles ne sont pas encore fortement développées ; **Bc** au bout de 48 heures de culture dans de la mélasse, les enveloppes sont plus développées, en partie emboîtées l'une dans l'autre ;
 C Un petit grumeau gélatineux, d'où les cellules sont sorties.

l'analogie établie précédemment entre ce champignon et le genre d'algues *Nostoc* (indiquée dans le nom *Leuconostoc*) est supprimée.

Dans de certaines conditions, les cellules sont revêtues d'une enveloppe gélatineuse très forte, composée d'un hydrate de carbone gommeux, nommé *dextrane*. Cette formation, qui est un produit d'assimilation, n'a lieu qu'en présence de saccharose et de glucose, et non pas dans des solutions de lactose, de maltose, de dextrine, attendu que ces hydrates de carbone, ainsi que la glycérine, ne sont pas assimilables. Suivant les conditions de culture, par exemple sur des pommes de terre, cette espèce se développe sous une toute autre forme, à laquelle l'enveloppe gélatineuse fait complètement défaut.

Le *Leuconostoc* fait fermenter la glucose, le sucre de canne (après inversion préalable), la lactose, la maltose et la dextrine avec production de gaz et d'acide que l'on reconnut être de l'acide lactique. Le champignon produit un ferment intervertissant le sucre de canne ; d'autres ferments ne purent être découverts.

Ce qu'il y a surtout de caractéristique, c'est la force de résistance de ce champignon, même aux températures élevées ; et en second lieu, c'est que les *jeunes* cultures supportent des chaleurs plus fortes que les anciennes. La végétation supporte par exemple une élévation successive de la température, poussée en quelques minutes, jusqu'à 86 ou 87° C. L'optimum de la température est situé entre 30 et 37° C.

Très remarquable est aussi l'effet favorable qu'exercent de grandes quantités de chlorure de calcium sur la croissance et l'action fermentative de ce champignon.

Mentionnons encore un *Streptococcus*, utilisé dans la fabrication du fromage d'Edam, où on l'ajoute à dessein au lait pour le rendre filant, ce qui donne à ces fromages leur caractère particulier.

7. — Bactéries à action intervertissante, diastatique et peptonisante.

La formation de ferments chimiquement solubles est très répandue dans le monde des bactéries. On reconnaît là-dedans un de ces moyens pour lesquels ces êtres vivants peuvent déployer une activité si grandiose dans l'économie de la nature.

D'après les recherches de *Hansen*, il y a aussi, parmi les bactéries qui se présentent généralement dans la bière, plusieurs espèces qui secrètent des *ferments intervertissants*. Parmi ces espèces, se trouve à son tour un groupe ayant une action intervertissante sur une solution pure de saccharose, qui cesse dès que l'on ajoute une décoction de levure. *Fermi* et *Montesano* observèrent que, par exemple, le *Bacillus Megatherium*, le *Proteus vulgaris* et le *Bacillus fluorescens liquefaciens*, transportés dans du bouillon neutre additionné de 4 0/0 de sucre de canne, intervertissent ce sucre. Plusieurs de ces bactéries perdent cependant leur pouvoir inversif, si on rend les bouillons alcalins ; par contre, la plupart d'entre elles ne souffrent pas dans des bouillons légèrement acides. Dans du bouillon sans sucre et dans des milieux sans albumine, ces bactéries produisent également de l'invertine ; ainsi presque toutes les espèces étudiées formèrent de l'invertine, dans une solution de sel nutritif avec de la glycérine. Chez ces bactéries, l'invertine peut être considérée comme ferment soluble (enzyme). Suivant l'espèce, ce ferment peut être détruit à différentes températures, mais il est toujours plus résistant pendant son action sur le sucre de canne, qu'à l'état soluble. Il est très sensible à l'action des acides et des alcalis et est surtout attaqué par

des acides minéraux et par la potasse (1). Des faits analogues à ceux que Hansen a relatés furent observés par *Wortmann* chez les bactéries qui développent des *ferments diastatiques*. Il les trouva sur des haricots ou sur des pommes de terre en putréfaction et fit les cultures dans des mélanges de sels nutritifs et de fécule de blé. *Marcano* trouva aussi une espèce à action diastatique qui se présente souvent dans l'enveloppe extérieure des grains de maïs. Dans le levain acide de boulangerie, *Peters* trouva un bacille dissolvant, l'amidon. Celui-ci produit, dans des cultures ordinaires sur plaques de gélatine, des colonies à échancrures caractéristiques composées de longs filaments, d'environ 0,5 μ d'épaisseur. Dans du moût de bière, le bacille forme des bâtonnets d'une mobilité extrême, qui produisent peu à peu un voile à la surface. Les spores ont la forme de bâtonnets.

On a aussi trouvé des bactéries qui *dissolvent les matières protéiques*, par exemple les *micrococcus prodigiosus*. Les bactéries peptonisantes, qui, suivant *Weigmann*, jouent un rôle dans la maturation du fromage, appartiennent à ce groupe.

8. — Formes de Sarcina.

Outre le *Pediococcus acidi lactici* mentionné plus haut, on trouve encore dans des liquides en fermentation un

(1) Suivant des recherches de *Ad. J. Brown*, le *Bacillus subtilis* (Bacille du foin) qui est généralement répandu, appartient aux bactéries de ce groupe. D'après cet auteur, cette bactérie ne peut se développer dans de la bière ou du moût à acidité normale, même quand l'acidité est très faible. Le sucre s'oxyde dans une infusion de foin neutre, additionnée de 5 0/0 de dextrose, et cette bactérie intervient et oxyde complètement le sucre de canne.

grand nombre d'espèces de bactéries globulaires, dont les conditions vitales ne sont que très imparfaitement connues. Dans la fermentation basse, comme dans la fermentation haute (surtout dans les distilleries et fabriques de levure pressée), on rencontre des *microcoques* dont l'action nuisible sur les liquides fermentés ou sur la levure, a été assidûment signalée dans les divers journaux techniques se rapportant à ces industries. Des expériences directes n'ont cependant réellement démontré l'existence de cette action que dans un seul cas tout à fait isolé (voir « Bactéries visqueuses »). Dans la bière de garde de fermentation basse, ces formes se présentent comme des corpuscules plus ou moins sphériques d'un gris d'eau, tantôt isolés, tantôt par groupes, le plus souvent réunis par quatre; ils ont été décrits par *Hansen* sous le nom de *Sarcina* (Fig. 24). On rencontre des organismes du genre de *Sarcina* dans des endroits très différents de la nature. Les véritables foyers de développement propres aux diverses espèces ne sont cependant pas encore connus.

Reinke observa que la bière de garde contaminée par ces bactéries formait rapidement des dépôts considérables et prenait un goût et une odeur désagréables. La bière blanche prenait souvent une couleur rouge et contenait alors une grande quantité de *Sarcina*, et une température un peu plus élevée en faisait, en peu de jours, considé-

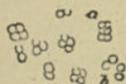


FIG 24.

Sarcina

ablement augmenter le développement. D'après *Reinke*, des températures de 10 à 14° paraissent être ici particulièrement favorables. Cependant il fait remarquer, avec raison, que l'on ne sait pas si c'est la *Sarcina* ou les bâtonnets toujours présents qui sont la cause véritable de la maladie mentionnée précédemment; on sait seulement que dans la bière rouge, la *Sarcina* caractérise des condi-

tions anormales ; mais des recherches décisives doivent encore déterminer si elle en est la cause ou l'effet.

Dans les résidus frais de distillerie, que l'on utilise comme fourrage, M. *Bräutigam* trouva un microcoque de la nature des *Sarcina*, qui possédait des propriétés pathogéniques. On n'a pas encore établi par des expériences directes, si ce dernier avait des rapports avec la maladie du peigne qui se présente chez les animaux de la race bovine.

Lindner étudia une série de ces organismes appelés *Sarcina* et nous donna de précieux renseignements relativement à la connaissance des conditions vitales de ces formes. Le « *Pediococcus cerevisiæ* » paraît dans les cultures comme coque, diplocoque ou tétrade. Des cultures dans du bouillon nutritif gélatinisé, recouvertes en partie de feuilles de plâtre, montrèrent que la présence de l'air activait la croissance des colonies de cette bactérie. Dans les premiers jours, toutes les colonies étaient incolores ; plus tard elles montrèrent le commencement d'une coloration jaunâtre ou jaune-brun. La gélatine n'était pas liquéfiée. Cultivé par inoculation en strie sur de la gélatine nutritive, cet organisme donna une bande à bordures assez unies, gris-blanc, humide, irisant vivement en fines couches ; ensemencé par piqûre, il se développa tout le long de la ligne d'inoculation et forma à la surface de la gélatine un point blanchâtre, qui se déploya en forme de feuille. Sur des tranches de pommes de terre cuites, cette espèce ne croît que difficilement et présente, lorsque de telles cultures sont devenues vieilles, des formes bizarres d'involution. Dans de l'infusé de viande gélatinisé, l'organisme fut tué dans l'espace de huit minutes à 60° C. ; par contre, il ne le fut pas même au bout de 12 minutes entre 50-55° C. Dans du moût houblonné, il forme un dépôt et plus tard un voile. Après l'action du *Pediococcus*, l'acidification du liquide est très faible et

l'auteur présume qu'il se forme des traces d'acide lactique. *Lindner* déclare que dans aucun cas il n'a réussi à provoquer une maladie proprement dite dans du moût ou de la bière, en infectant ces liquides avec une végétation vigoureuse de cette bactérie ; aussi observe-t-il que ce n'était peut-être pas du tout cette espèce qui occasionnait une altération du goût de la bière, mais plutôt d'autres bactéries que l'on rencontre en même temps dans la bière contaminée.

On admet que dans de certaines conditions, les formes de *Sarcina* peuvent susciter des troubles dans la bière de fermentation basse. *Schoenfeld* ensemença une végétation d'une de ces espèces, cultivée dans de l'eau de levure gélatinisée et ensuite sur de l'eau de levure gélatinisée immergée dans de l'eau de levure, dans de la bière pasteurisée à 55° R. La bière devint trouble au bout de quelque temps et prit une odeur et un goût aigre-doux désagréable. Le trouble se produisait le plus vite lorsque la bière n'était presque pas en contact avec l'atmosphère.

Nous avons parlé plus haut de l'espèce visqueuse décrite par *Lindner*.

A. Petersen a observé qu'un riche développement d'une *Sarcina* pouvait se produire dans de la bière de fermentation basse sans qu'aucune maladie ne se manifestât ; la bière était au contraire limpide, elle se conservait bien et avait un arôme et un goût fins. Il existe donc des espèces de *Sarcina* ne provoquant pas de troubles dans la fabrication.

Ceci a aussi été observé par l'auteur du présent ouvrage. Souvent on a analysé dans son laboratoire des séries d'échantillons de bière de garde, qui avaient tous ce qu'on appelle « l'odeur et le goût de la *Sarcina* », mais on ne rencontra pas toujours dans les échantillons un développement d'organismes du genre *Sarcina*.

Reichard a isolé d'une bière de fermentation basse une forme de *Sarcine* qui se développait facilement dans du moût non houblonné, mais par contre pas dans de la bière pasteurisée. Cette espèce montra le meilleur développement à l'abri de l'air. Dans quelques cas, les essais de fermentation montrèrent des altérations particulières de goût ou des troubles, dans d'autres cas pas. L'auteur cité conclut, d'après ses nombreuses expériences, que ces résultats variables provenaient soit de l'état des différentes végétations de cette forme de *Sarcine*, soit de la marche de la fermentation, surtout de la fermentation secondaire. Quand la fermentation dans les foudres était calme, la végétation restait déposée au fond et les bactéries n'exerçaient aucune influence préjudiciable sur le liquide ; mais dans les fermentations secondaires énergiques, elles étaient charriées à la surface par les bulles d'acide carbonique, et aussitôt la maladie se déclarait. Il serait donc dangereux, dans des cas pareils, d'ajouter à la bière du moût en fermentation (des *Kraeusen*). L'introduction de houblon cru dans les foudres, entrave le développement de ces bactéries, comme en général de toutes celles qui se présentent dans la bière.

Les analyses de *vins clairs*, effectuées au laboratoire de l'auteur, ont souvent révélé la présence de vigoureuses végétations de formes de *Sarcine*. Le vin avait en même temps adopté une odeur et un goût particuliers, rappelant celui des bières contaminées ; mais nous ne possédons pas encore de recherches expérimentales sur l'influence qu'exercent ces végétations sur le caractère du vin.

Toute cette question n'a d'ailleurs pas encore été étudiée bien amplement.

Les formes de *Sarcina*, comme toutes les bactéries reconnues nuisibles, et les levures sauvages, se trouvant en fort développement surtout dans le dépôt des foudres,

il faut avoir soin, dans toute brasserie où une infection se présenterait, d'éviter sa propagation, en éloignant immédiatement après le soutirage, tout le dépôt contenant la végétation.

8. — *Crenothrix*.

Dans les études microscopiques de l'eau, on rencontre très souvent les formes bien prononcées du *Crenothrix Kühniana* ou peste des puits (Fig. 23), qui a été décrit par Cohn et Zopf.

Cette bactérie se présente dans toute eau contenant des substances organiques (où elle est souvent accompagnée de la *Beggiatoa alba*) ; quelquefois elle se développe à un tel degré qu'elle peut rendre l'eau impropre à tout usage. D'après Zopf, elle causa de grandes calamités dans les conduites d'eau de Berlin, de Lille et de certaines villes russes. Par suite de la faculté qu'elle possède de pouvoir emmagasiner des *composés ferrugineux* dans ses parois, elle forme dans l'eau des flocons rougeâtres ou bruns. Ses formes sont très belles ; elle se présente sous l'aspect de coques (a-f) qui, par division et sécrétion de matières visqueuses, forment des zoogléés. Ces coques peuvent aussi s'allonger en filaments articulés munis d'un étui distinct (h, i-r). Ils augmentent en épaisseur vers l'extrémité libre, et lorsqu'ils ont atteint un certain âge, ils se séparent, à l'intérieur de l'étui, en plus petits membres, qui s'arrondissent et sortent comme bâtonnets, macrocoques ou microcoques.

Une espèce analogue est le *Cladothrix dichotoma*, qui présente de fausses ramifications et dont les filaments produisent des conidies sous forme de bâtonnets, qui essaient.

Winogradsky démontra que ces bactéries ne peuvent se développer qu'en présence de protocarbonate de fer dans le milieu. Les grands gisements d'ocre de fer et de limonite que l'on rencontre dans la nature, semblent provenir du travail de ces bactéries (1).

(1) On peut citer les *Sulfuraires* ou *Sulfo*bactéries, décrites par *Cohn*, *Warming*, *Engler* et principalement par *Winogradsky*, qui vivent dans l'eau et dont beaucoup d'espèces produisent une matière colorante rouge. Vues au microscope, elles contiennent des corpuscules ronds, très réfringentes, qui sont des granulations de soufre pur. Elles sont aérobies et se trouvent surtout dans les eaux qui contiennent de l'hydrogène sulfuré. Cette substance est oxydée par les bactéries et le soufre libéré est fixé dans les cellules. Parmi les espèces filamenteuses, il faut surtout citer la *Beggiatoa alba*.

Des bactéries jouant un grand rôle dans la nature, sont celles qui transforment les sels ammoniacaux en *nitrats*, si importants dans la nutrition de tant de végétaux. C'est à *Schlösing* et à *Müntz* que nous devons les premiers travaux sur ce sujet, et *Winogradsky* a établi le fait par des cultures pures. Parmi ces *bactéries nitrifiantes*, il en existe quelques-unes qui oxydent l'ammoniaque en acide nitreux après quoi d'autres espèces transforment ce dernier en acide nitrique. Ces bactéries produisent aussi le *salpêtre des murs*, qui attaque souvent fortement les murailles, dont la surface dégage des amas neigeux d'azotate de chaux. On peut remédier à cet inconvénient par l'emploi d'antiseptiques.

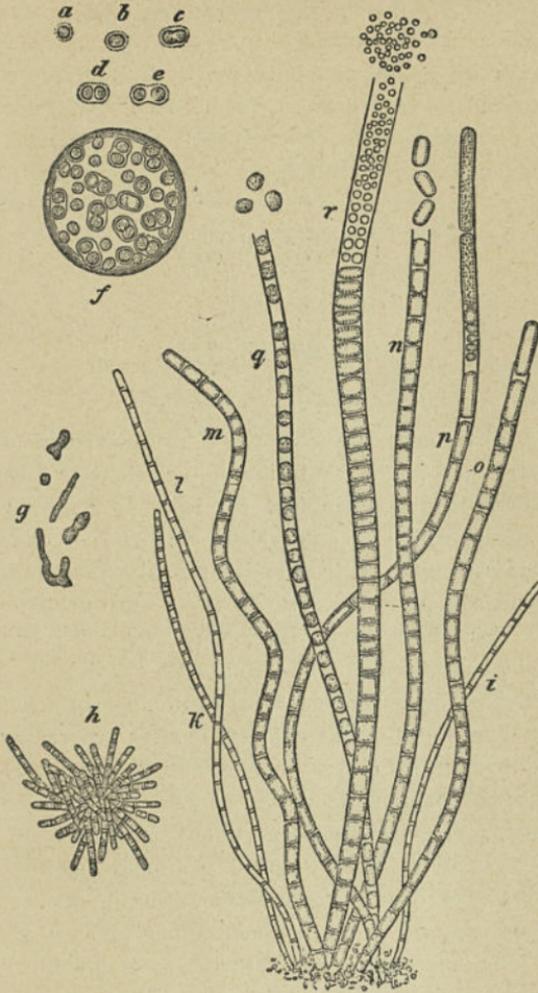


FIG. 25.

Crenorthrix Kühniana d'après Zopf.

a — **e** (600 : 1) coques dans diverses phases de division, **f** (600 : 1) petite zooglycée ronde avec des coques, **g** zooglycées (*g* : andeur naturelle), **h** (600 : 1) colonie de filaments courts composés de cellules ayant la forme de bâtonnets et produits par la germination d'un petit amas de coques; **i** — **r** filaments droits ou recourbés en spirale (**l**, **m**), de grosseur très variable, avec contraste plus ou moins prononcé entre la base et le sommet, dans différentes phases de division de leurs membres et formation d'étuis; Le filament à étui **r** montre des bâtonnets courts à sa base divisés en petites parties cylindriques vers le haut; au sommet, on voit les coques provenant de la division longitudinale des disques cylindriques.



CHAPITRE IV

LES MOISSURES

Les moisissures interviennent ordinairement dans l'industrie de la fermentation d'une manière quelque peu différente que ne le font les bactéries. Tandis que celles-ci apparaissent en grande quantité — dans les distilleries comme règle générale, dans les brasseries seulement exceptionnellement — et peuvent, par là, occasionner des changements importants dans le cours et dans les résultats de la fermentation ; les moisissures, au contraire, se présentent en dehors du champ proprement dit de la fermentation, s'installant sur les vases, sur les ustensiles, dans les divers locaux, sur le malt vert, sur la levure en repos et de préférence sur la levure hautè. Par conséquent, les moisissures ont ordinairement une importance plutôt subordonnée, mais néanmoins très réelle. Que l'on examine attentivement un de ces champs de moisissures qui se développent à la voûte ou sur les bords d'un vase, on reconnaîtra bientôt qu'on ne se trouve pour ainsi dire jamais en présence d'une seule végétation de moisissures *isolée*, et que l'on rencontre presque toujours parmi ses filaments des bactéries et des cellules de levure. Les filaments des moisissures poussent en hauteur et soulèvent ainsi les éléments étrangers qui, dans cette position exposée, sont plus facilement charriés soit par les ouvriers, soit par l'air.

Toutes espèces d'organismes microscopiques prennent naissance pendant le maltage des matières premières féculentes. Si l'on considère ordinairement les moisissures comme les ennemis les plus dangereux, ceci tient certainement à ce que pendant leur développement, ils sont visibles à l'œil nu et qu'ils s'imposent ainsi d'une façon immédiate à notre attention. Si la *supériorité numérique* devait servir de base, c'est aux bactéries, qui abondent toujours sur le malt vert, que reviendrait certainement la première place. Jugé à ce point de vue là, on peut donc être dans le doute quand on se demande à qui l'on doit attribuer la plus grande influence sur le produit, si c'est aux moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, etc.) lorsqu'on rencontre leurs luxuriantes végétations sur le malt, ou si ce ne sont pas plutôt leurs nombreux associés qui jouent ici le rôle prépondérant.

À la surface de petits morceaux de levure pressée, l'auteur de ce livre a souvent trouvé une fine couche blanche qui se composait le plus souvent d'un mycélium de moisissures appartenant principalement aux groupes *Oidium*, *Chalara* et *Dématium*. Il est bien possible que lorsque ces plantes forment une couche assez épaisse à la surface de la levure, elles retiennent, par leur respiration, une partie de l'oxygène libre qui est indispensable à la levure pour pouvoir se conserver pendant assez longtemps en vie. Ici encore se présentèrent toujours sans exception, des formes bactériennes.

La vérité est donc, d'après les expériences faites dans la pratique, qu'une formation de moisissures peut presque toujours être considérée comme un signe, que d'autres organismes sans doute plus nuisibles et d'une action plus puissante, sont en voie de développement. Il est par conséquent très important que les murs des caves de fermentation soient *unis*, ce que l'on obtient le plus sûrement par l'emploi déjà très répandu des couleurs à l'émail.

Nous donnons ici un aperçu des principales formes de moisissures présentant de l'intérêt pour l'industrie de la fermentation.

1. — *Botrytis cinerea* (*Sclerotinia Fuckeliana*).

Cette espèce (Fig. 26) forme de petits champs gris-jaune sur des matières végétales humides qui dépérissent, et se trouve également dans le moût. Du *mycélium* brun-grisâtre s'élèvent des filaments conidifères ayant l'aspect de tubes perpendiculaires et articulés, ordinairement arrangés en forme de touffes. Ils croissent jusqu'à la hauteur de 1 m/m, après quoi la cellule du sommet pousse près de son extrémité de 2 à 6 petites branches, qui forment un angle presque droit avec l'axe (C'). Les branches intérieures sont les plus longues ; à leur tour, elles donnent naissance au-dessous de leur extrémité à un ou plusieurs rameaux latéraux. Les branches supérieures sont presque aussi larges que longues. Il se développe ainsi un système de ramifications ayant l'aspect d'une grappe de raisins. La croissance longitudinale terminée, les rameaux séparent par une cloison transversale leur espace intérieur du tronc principal et cela tout près de celui-ci. En même temps, l'extrémité des rameaux et du tronc principal se gonflent en forme de globules et offrent à leurs surfaces supérieures plusieurs petites éminences, placées l'une à côté de l'autre. Celles-ci poussent rapidement en formant des vésicules ovales, remplies de plasma et se rétrécissant à leur base en forme de tube. Lorsque ces conidies (C, C') sont complètement développées, les parois des branches se resserrent, ce qui rapproche tellement les conidies les

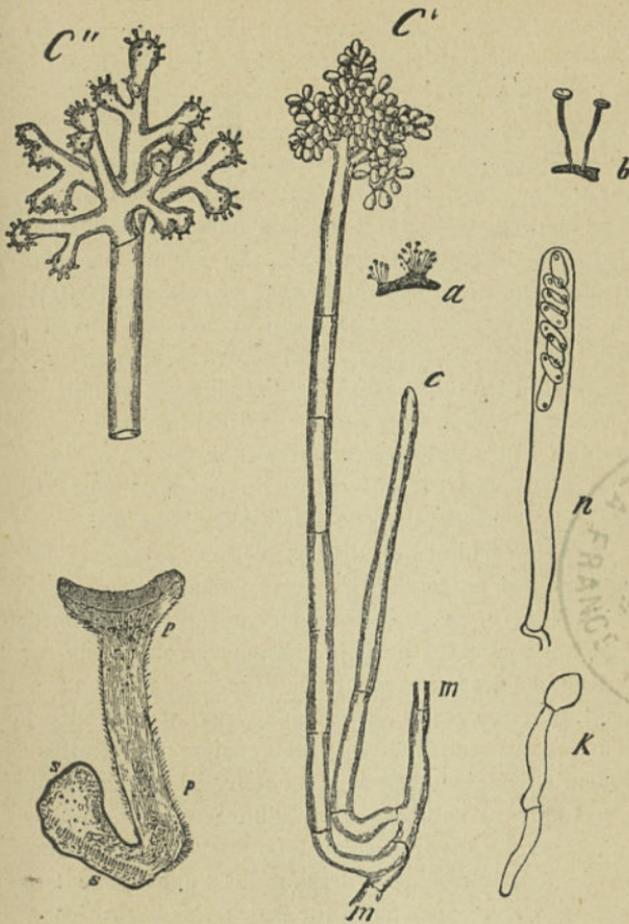


FIG. 26.

Botrytis cinerea d'après de Bary.

- a, b (grandeur naturelle) sclérotés, d'où croissent a des appareils conidiens, b des périthèces ; c C' filaments conidifères (C' avec des conidies venant de mûrir) partant du tube mycélien m ; C'' extrémité d'un appareil conidien montrant le commencement de la formation des conidies à l'extrémité des rameaux ; k conidie germinante (gros-sissement 300) ; p, s (faiblement grossi) coupe au travers d'un sclérote s, duquel pousse un petit périthèce (p, p) ; n asque isolé avec 8 spores mûres (grosissement 300).

unes des autres, qu'elles finissent par former une agglomération lâche et irrégulière, qui se détache facilement. Si l'on place cette grappe dans de l'eau, les conidies se dégagent de leurs pédoncules; les pellicules des rameaux vides de plasma se resserrent ou n'apparaissent plus que par traces: leurs anciens points d'attache au tronc principal ne s'aperçoivent plus guère que comme des petites cicatrices légèrement convexes. Le second membre du filament sporifère peut alors chasser celui de l'extrémité qui s'est resserré, pousser à son tour en hauteur et former une nouvelle grappe. Ceci pouvant se répéter plusieurs fois, les tubes conidifères atteignent une longueur considérable. Dans certaines conditions de nutrition, les conidies et les ascospores germent de façon à détacher d'un fil germinatif très court, ou de porte-conidies en forme de bouteille, des conidies rondes hyalines.

Dans de certaines conditions, cette plante peut entrer dans un état particulier de repos nommé sclérote (*scleros* = dur) (a, b, ss¹). Les filaments mycéliens se ramifient abondamment et les branches s'enchevêtrent en un corps continu, depuis la forme circulaire jusqu'à celle en fuseau étroit, et d'une grandeur variable pouvant atteindre jusqu'à quelques millimètres; les dernières extrémités des filaments deviennent brunes ou noires, et le sclérote solide et mûr se compose ainsi d'une enveloppe noire et d'un tissu intérieur incolore. De Bary décrit ces corps sous le nom *Sclerotinia Fuckeliana*. Ils apparaissent sous forme de corpuscules noirs sur les parties herbacées d'un grand nombre de végétaux ou ils vivent en parasites ou en saprophytes. Ils sont capables, après une période de repos — d'au moins une année — de donner naissance à une végétation nouvelle.

Si l'on porte le sclérote, peu après sa maturation, sur un milieu humide, les rameaux intérieurs incolores croissent au travers du contour noir et s'élèvent en filaments

conidifères (a). Mais si l'on ne porte les sclérotés qu'après un repos prolongé sur le milieu humide, le tissu intérieur développe une grosse touffe de filaments qui croissent perpendiculairement et s'élargissent finalement en un disque en forme de plat (*b* et *ps*). Sur la surface supérieure libre du disque, les extrémités des filaments sont parallèles, quelques-unes restent grêles, d'autres se gonflent pour former des tubes semblables à des massues, dont chacun produit, dans son intérieur 8 spores ovales (a). La plante est alors entrée dans la période de sporulation. Les spores germent après avoir été expulsées et les fils germinatifs croissent en formant des appareils conidiens.

D'après *Bersch, Fitz et Reess*, cette moisissure est considérée comme la cause d'une des maladies du vin, qui se manifeste par un goût et une odeur de fumée désagréables. De semblables cas de maladie ont été observés isolément dans la brasserie ; il n'est cependant pas certain qu'ils provinssent de cet organisme.

Lorsque dans des années pluvieuses, le *Botrytis* s'attaque aux raisins, à une époque où les grains ne sont pas encore devenus tendres, le mycélium, dont les filaments traversent l'épiderme, détruit le peu de sucre qui se trouve encore dans les grains. Les cellules étant tuées, une nouvelle introduction de sucre par les feuilles est entravée ou rendue impossible. Les grains de raisin attaqués, pourris avant leur maturité, nuisent à la qualité du vin. Comme le mycelium pousse aussi dans les rafles, dont il occasionne le dépérissement, les tout jeunes grains d'une telle grappe ne peuvent guère mûrir et se dessèchent. Dans de bonnes années vineuses, ce champignon n'apparaît ordinairement que vers les vendanges où il est alors moins dangereux pour les raisins. Dans certaines contrées, par exemple dans le Rheingau, à Sauterne, on aime voir cette pourriture tardive, dite « *pourriture*

noble », parce que les grains attaqués contiennent bien moins d'acide que ceux qui sont restés indemnes et fournissent par conséquent un vin particulièrement agréable et moelleux.

2. — *Penicillium glaucum*.

Une forme de moisissure bien plus répandue dans l'industrie de la fermentation, et que l'on trouve surtout sur le malt vert, est le *Penicillium glaucum* (Fig. 27). Il forme sur le milieu une couche panniforme d'abord blanche, puis verdâtre ou d'un bleu gris et se développe avec une très grande rapidité. Le mycélium se compose de filaments transparents, ramifiés et cloisonnés qui, plongés dans des liquides, peuvent se gonfler irrégulièrement. De ces filaments partent les appareils conidiens (A), qui s'élèvent perpendiculairement. Ils consistent en cellules cylindriques allongées, dont la cellule terminale arrête bientôt sa croissance longitudinale pour prendre une forme subulée; la cellule sous-jacente pousse une ou plusieurs ramules opposées qui s'élèvent tout près de la cellule terminale et consistent, comme celle-ci, en une cellule subulée. Chez les exemplaires plus vigoureux, les branches peuvent encore se ramifier (voir Fig. 27 A, en haut), ou bien il naît des cellules suivantes des rameaux semblables qui, comme cela a été dit plus haut, se ramifient et se terminent en pointe. Dans cette touffe de branches, chaque cellule subulée (*sterigma*) détache une série de conidies globuleuses, et finalement la touffe porte une masse entière de conidies arrangées en séries qui sont facilement dispersées lorsqu'elles sont mûres. Ces conidies, rondes et unies, donnent au champ de moi-

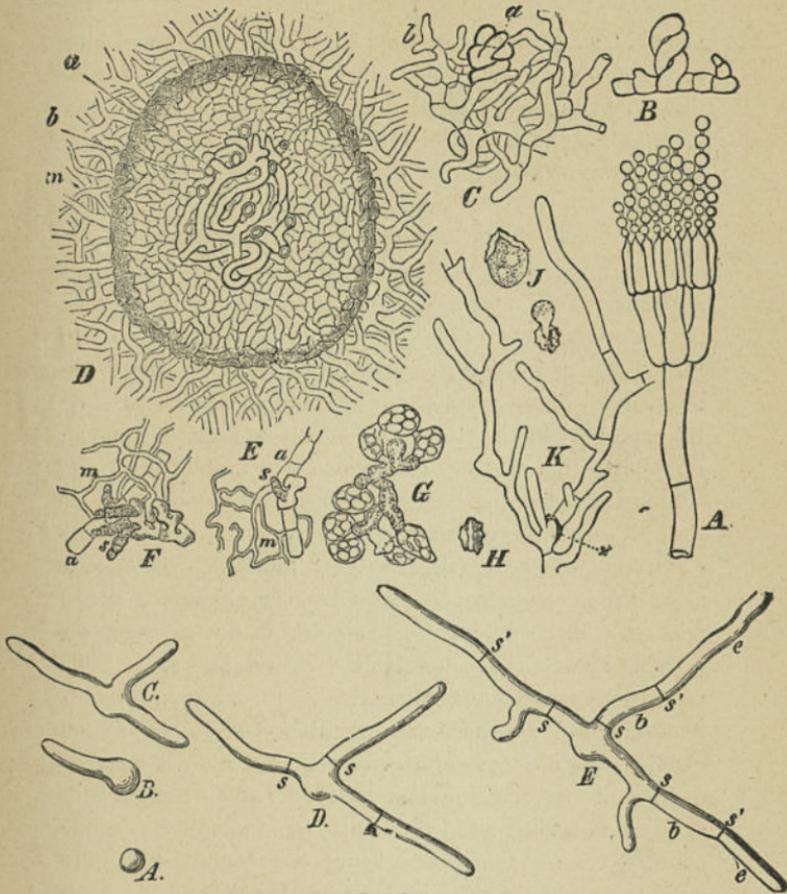


FIG. 27.

Penicillium glaucum a après Brefeld et Zopf.

A Appareil conidien. B organes génitaux. C sclérote en voie de développement (a hyphes-ascogènes, b filaments stériles); D coupe d'un sclérote très jeune (a hyphes ascogènes, b partie stéril- du sclérote m mycélium); E et F hyphes ascogènes (a) avec des jeunes asques (s) et des filaments mycéliens stériles (m) d'un sclérote plus développé; G groupe d'asques avec spores; H spore; J spores germantés; K jeune mycélium (près x la spore). — A-E (en bas). Germination de la conidie d'après Zopf (grossissement plus fort) : A conidie avant la germination; B la même ayant développé un tube germinatif; C trois tubes germinatifs sont formés; D chacun de ces tubes est séparé de la spore par une cloison (s); E chaque tube germinatif s'est divisé par une nouvelle cloison (s') en une cellule terminale et en une cellule intérieure (b).

sissures sa couleur gris-bleu bien connue ; quand elles sont semées sur des milieux humides, elles ont la faculté de germer immédiatement. D'après les recherches de *Cramer*, elle sont très résistantes à l'action des températures élevées. Dans des essais de culture de cet organisme, *Brefeld* fit l'intéressante observation que dans de certaines conditions, le *Penicillium* pouvait présenter un mode de croissance toute différente. Il enferma des cultures de cette moisissure sur des tranches de pain bis sans levain, entre des plaques de verre, et les laissa se développer autant que possible à l'abri de l'air atmosphérique. On voit alors sur le mycélium des couples de branchettes courtes et épaisses s'enlaçant (*B* en haut) ; une partie de ces vis commence à pousser des tubes courts (*C*), tandis que le fil mycélien qui porte la vis produit de nombreux rameaux fins qui enveloppent la vis et forment une paroi (*D*), possédant une couche intérieure assez solide et une couche extérieure panniforme. Peu à peu les cellules intérieures se colorent en jaune et les cellules extérieures, plus lâches, sont repoussées. Dans ce petit globule jaune (*Sclerote*) il s'opère, par une ramification continue des spirales mentionnées, une formation graduelle de cellules gonflées (*asques*) (*E, F, G*), dans lesquelles il naît chaque fois huit spores. Celles-ci sont épaisses, lenticulaires, munies à leur périphérie d'une rainure circulaire et sur leur membrane extérieure (*exospore*) de 3 à 4 petites nervures. Après l'effondrement et l'absorption de tous les autres éléments intérieurs, les spores deviennent enfin libres et le petit globule jaune est rempli de la poussière des spores. Tout ce développement dure six à huit semaines. Les sporocarpes peuvent être conservés à l'état sec pendant des années sans perdre leur propriété germinative. Quand on sème les spores (*H*) l'exospore se fend à la rainure circulaire pour former comme une soupape, et l'endospore se gonfle et émerge (*I*)

en s'allongeant en un tube germinatif, qui produit aussitôt les appareils conidiens.

Ce champignon se présente très souvent dans le *vin*, où il occasionne de graves altérations. Il se développe énergiquement dans des fûts mal nettoyés. où il pénètre dans le bois qu'il décompose en produisant des matières dont l'odeur et la saveur désagréables se transmettent plus tard au vin. Dans des années humides, il pullule souvent sur les raisins, s'attaque aux grains, qui contractent alors une pourriture particulière. Le mycélium semble s'introduire, non seulement dans les grains endommagés, mais encore dans ceux qui sont restés intacts. Ceux-ci deviennent peu à peu jaune-brun ou jaune-vert et le champignon développe ces produits de décomposition, qui donnent au vin le goût de moisi. Les conidies du champignon peuvent aussi germer dans le jus de raisin, et le mycélium doit ici également exercer une influence nuisible.

Le *Penicillium* possède le pouvoir de sécréter un *ferment intervertissant* capable de convertir le sucre de canne en d'autres sucres ; cette espèce renferme aussi de la diastase et de la maltase (Bourquelot).

Le *Penicillium* est employé dans la fabrication du Roquefort.

Les deux formes décrites par *Wehmer*, le *Citromyces Pfefferianus* et le *C. glaber*, ont à peu près la même structure que le *Penicillium*. Lorsque l'air a suffisamment accès et que la température est favorable, elles peuvent transformer le sucre en *acide citrique*, dans des milieux nourriciers convenables, qu'elles recouvrent d'un gazon vert. Le peu de sensibilité que manifestent ces deux champignons vis-à-vis de l'acide citrique formé dans le liquide nourricier, même lorsque cet acide est relativement concentré, est remarquable, tandis que de petites quantités d'autres acides, surtout d'acides minéraux, exercent déjà une influence enrayante sur leur croissance. D'après l'au-

teur cité, ces deux champignons sont employés industriellement à la fabrication de cet acide.

On a également employé une espèce de *Mucor* (*M. pyriformis*) dans le même but.

3. — *Eurotium Aspergillus glaucus*.

Le développement de l'*Eurotium Aspergillus glaucus* (Fig. 28) a été décrit pour la première fois, par le célèbre de *Bary*. Il forme une fine couverture panniforme, grisâtre ou d'un gris-vert, sur les corps les plus divers et peut apparaître en quantité exubérante sur le malt vert.

Comme dans le *Penicillium*, le mycélium se compose de filaments fins, cloisonnés, transparents et ramifiés. Quelques-uns des fils mycéliens s'élèvent perpendiculairement ; ils sont alors plus gros que les autres et ce n'est que par exception qu'ils sont ramifiés ou cloisonnés.

Fig. 28.

Eurotium aspergillus glaucus, d'après de *Bary*.

m m filament mycélien portant un tube conidifère **c** (dont les conidies se sont détachées), un périthèce **F** et les premiers rudiments d'un ascogone **f** (grossissement 190 fois); **s** trois stérigmates du sommet d'un appareil conidien montrant le détachement des conidies; **p** conidie en germination (grossissement 250-300 fois); **A** asque, **r** ascospore en germination, **k** tubes germinatifs; **S** ascogone héliciforme, **p** premier rudiment d'un filament enveloppant, croissant en hauteur; **T** phase de développement plus avancée; **W** ascogone complètement entouré de l'enveloppe; **V** coupe longitudinale d'une phase plus ancienne de développement, au centre l'ascogone entouré de l'enveloppe se composant de plusieurs couches; **X** coupe longitudinale d'une phase de développement plus avancée; l'ascogone est entouré d'une enveloppe ayant plusieurs couches, il a desserré ses tours et commence à pousser les rameaux formant les asques; **M** partie d'une vieille branche fertile, **a** jeune asque, **a**, un vieil asque rompu.

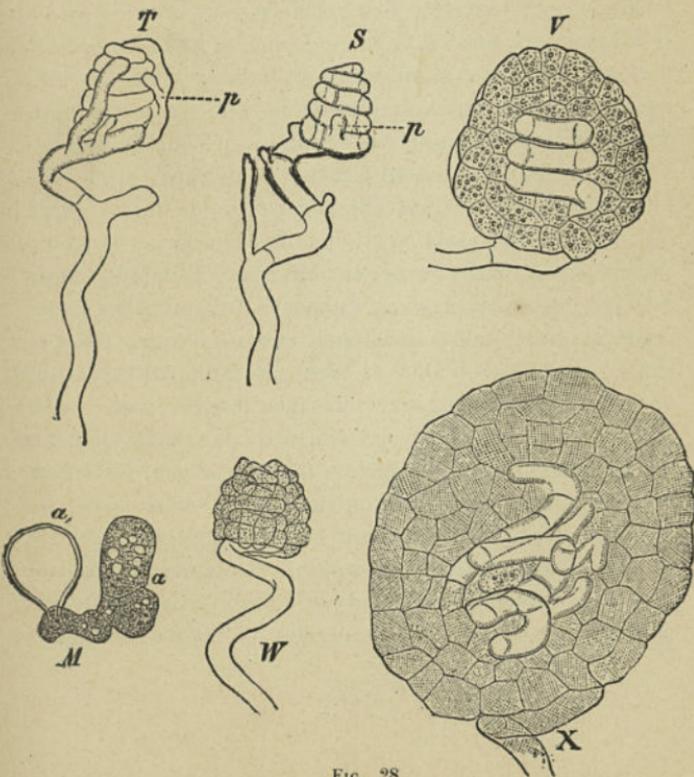
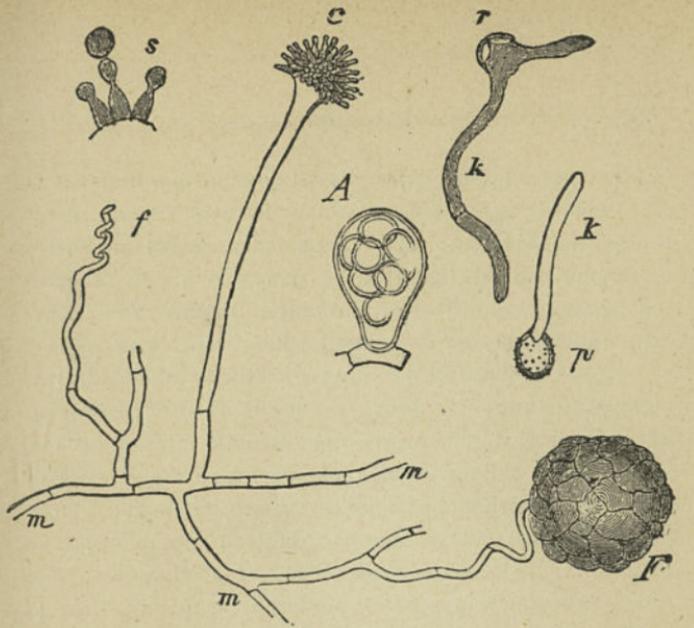


FIG. 28.

Leur extrémité supérieure grossit pour former un renflement sphérique (*c*), qui pousse sur toute sa surface supérieure des filaments cylindriques divergeant en forme de rayons. Ces stérigmates (*s*) poussent à leur tour à leur sommet de petites excroissances rondes, qui s'attachent par leur base fortement rétrécie aux stérigmates et forment quelque temps après des cellules indépendantes (spores ou conidies). Sous la ligne d'attache de la première spore, il s'en forme une seconde au sommet du stérigmate ; celle-ci soulève la première ; puis il s'en forme une troisième, et ainsi de suite. Chaque stérigmate porte un chapelet de spores, dont la plus jeune se trouve ainsi la plus rapprochée du stérigmate. Ceci a lieu en même temps sur toute la surface de l'extrémité gonflée du tube conidifère, qui, finalement, se recouvre ainsi d'une grosse tête de chapelets de spores arrangés en rayons. Cet amas de spores forme la poussière gris-vert qui recouvre la masse mycélienne. A la fin, les conidies se séparent l'une de l'autre. Elles sont à ce moment légèrement verruqueuses à leur surface. Ces corpuscules sont immédiatement à même de germer (*p*) et produisent aussitôt une nouvelle moisissure, ce qui explique la rapidité avec laquelle cette plante se propage. Dans de certaines conditions encore insuffisamment établies, mais qui paraissent en tous cas, supposer une nutrition abondante, la moisissure développe des *périthèces*. Ceux-ci sont d'abord semblables à des rameaux délicats qui, après avoir terminé leur croissance longitudinale, commencent à tourner leur extrémité quatre à six fois en hélice, comme un tire-bouchon (*f*). Peu à peu, les spires se rapprochent jusqu'à ce qu'enfin elles se touchent, de sorte que toute l'extrémité du filament finit par prendre la forme d'une hélice (*ascogone*). La spire inférieure de l'hélice développe alors deux ou plusieurs petits rameaux qui y sont fortement attachés. L'un de ces petits

rameaux (S, T, p) devance l'autre dans sa croissance, et son extrémité supérieure atteint rapidement le sommet de l'hélice, avec lequel il se fusionne. Le second rameau et tous les autres, s'il y en a plusieurs, s'élèvent également le long de l'hélice en se ramifiant et en se croisant de façon à ne former finalement tous ensemble plus qu'une enveloppe compacte qui renferme l'hélice (W). Ces rameaux se divisent par des cloisons perpendiculaires à la surface, et l'enveloppe se trouve ainsi formée de cellules courtes, anguleuses, dans lesquelles naissent de nouvelles cloisons parallèles à la surface, ce qui rend l'enveloppe plus épaisse en lui donnant plusieurs couches (V, X, F). Le petit globule désormais formé a environ 1/4 de millimètre d'épaisseur, la couche extérieure en devient jaune, tandis que celles de l'intérieur restent délicates et périssent plus tard. L'hélice enfin s'étend et pousse de tous les côtés des branches ramifiées qui repoussent les couches intérieures de l'enveloppe ; ces branches prennent enfin la forme d'asques (M et A), dont chacun développe huit spores à l'intérieur. Après la rupture des asques, les spores restent éparses dans le sporocarpie et sortent par les crevasses de l'enveloppe devenue fragile.

Come chez le *Penicillium*, les spores sont biconvexes verruqueuses, possèdent une forte membrane extérieure et une intérieure qui, à la germination, fend la première pour en former deux valves (*r*).

L'*Eurotium Aspergillus glaucus* possède un ferment diastatique transformant l'amidon en dextrine et en maltose.

Outre cette espèce, il s'en présente dans la nature encore plusieurs autres proches parentes qui peuvent, elles aussi, se rencontrer dans les mêmes localités. Ainsi, d'après Cohn, l'*Aspergillus fumigatus* serait la cause de l'échauffement, jusqu'à 60° C. et au delà, des couches d'orge germante mal travaillées.

Suivant des observations de *Gayon et Bourquelot*, l'*Aspergillus (Sterigmatocystis) niger* possède une série de différents ferments, par exemple de la diastase, de l'invertine, de la maltase et de l'émulsine.

De la plupart de ces espèces, on ne connaît que la phase des conidies.

4. — *Aspergillus Oryzæ*.

Pour la préparation du *vin de riz japonais* (saké) fortement fermenté, on emploie méthodiquement l'*Aspergillus oryzaë*. Les grains de riz débarrassés de leur balle, se préparent à la vapeur, tout en évitant l'agglomération et l'agglutination des grains. Pour préparer un malt pouvant servir au brassage avec ces grains, qui sont incapables de germer et chez lesquels l'action diastatique ordinaire est par conséquent exclue, on mélange la masse de grains avec ce qu'on nomme le « *Tane Koji* », c'est-à-dire avec des grains de riz enveloppés et recouverts du mycélium et des porte-sporanges de l'*Aspergillus oryzaë*. On peut aussi ne faire que mélanger la masse jaune-brune, formée par les spores de la moisissure, aux grains de riz échaudés. A l'air humide et chaud, il se développe sur le riz, dans l'espace d'environ trois jours, un mycélium blanc et velouté qui donne à la masse un parfum agréable de pommes et d'ananas. Avant que la fructification ait lieu, on ajoute de nouvelles quantités de riz échaudé qui s'enveloppent également d'un mycélium, et l'on répète plusieurs fois cette opération. Dans la masse du koji ainsi produite, une partie de l'amidon a été transformée, et une part des substances albumineuses, auparavant insolubles, est devenue soluble. On brasse la masse du koji en mé-

langeant 21 parties de koji et 68 parties de riz cuit à la vapeur avec 72 parties d'eau. Abandonnée à elle-même à environ 20° C, cette masse en bouillie (" Moto ") devient claire au bout de peu de jours, la saccharification de l'amidon et de la dextrine avance de plus en plus. Il se produit en même temps une fermentation spontanée très lente.

Dans cette fermentation, il se présente entre autres un *Saccharomyces* pouvant produire des taux élevés d'alcool. Puis on chauffe la masse jusqu'à environ 30° C. Après deux ou trois semaines, la fermentation principale est terminée. Ce produit filtré est soumis à une fermentation secondaire et l'on obtient un liquide jaune, limpide, ressemblant au *sherry* et contenant de 13 à 14 0/0 d'alcool. Il est souvent pasteurisé à 44° C. dans des chaudières en fer.

Suivant *Kellner*, l'*Aspergillus Oryzæ* joue aussi un rôle essentiel dans la fabrication du *Shoyu chinois* ou *Soja*. La matière première est un mélange de grains de Soja, de blé, de sel marin et d'eau. Une partie du blé est pilée, étuvée, et mélangée avec du koji, tandis que l'autre partie est grillée et moulue. Puis les deux parties sont ajoutées aux grains pilés et cuits, et les champignons du koji recouvrent la masse entière. Au bout de quelques jours, cette masse est amenée dans de grandes cuves avec du sel et de l'eau et abandonnée à une fermentation qui dure souvent plusieurs années. Puis on exprime le liquide du marc.

Atkinson trouva dans le koji un ferment soluble dans l'eau, intervertissant le sucre de canne et qui convertit la maltose, la dextrine et l'empois d'amidon en dextrose. Les recherches de *Kellner*, *Mori* et *Nagaoka* montrèrent également que la masse du koji possède un ferment fortement intervertissant, qui transforme le sucre de canne en dextrose et en lévulose, la maltose en

dextrose, l'amidon en dextrine, en maltose et en dextrose. Les divers microorganismes qui se trouvent dans la masse du koji sont probablement porteurs de différents ferments intervertissants.

Pour préparer le Soja et la bouillie de ces grains, appelée " *Taotjiong* " on se sert, dans l'île de *Java*, de l'*Aspergillus Wentii* qui apparaît spontanément sur les grains de Soja et dont *Wehmer* nous a donné la description. Cette espèce produit un mycélium blanc de neige, coloré plus tard en brun par les conidies sphériques, ordinairement finement verruqueuses. Les stérigmates ne sont pas ramifiés. Suivant *Prinsen Geerlig*s, qui nous a renseigné sur l'application industrielle de ce champignon, celui-ci possède non seulement un ferment peptonisant et diastatique mais peut, en même temps, dissoudre en partie les parois cellulaires des grains du Soja. D'après *Went*, ce champignon développerait aussi des périthèces.

5. — *Mucor*.

Le genre *Mucor* appartient aux plus intéressants du groupe des moisissures qui nous occupent ici, car il contient des espèces ayant une action fermentative très prononcée. Elles apparaissent comme un feutre gris ou brun d'une hauteur quelquefois très considérable — jusqu'à quelques pouces —, dans lequel l'œil distingue de fins globules jaunes, bruns ou noirs.

Nous donnons ici la description des espèces qui sont le plus répandues.

Mucor Mucedo (Fig. 29), une des plus belles formes de moisissure, qui se trouve par exemple très généralement sur le fumier des herbivores, a un mycélium blanc,

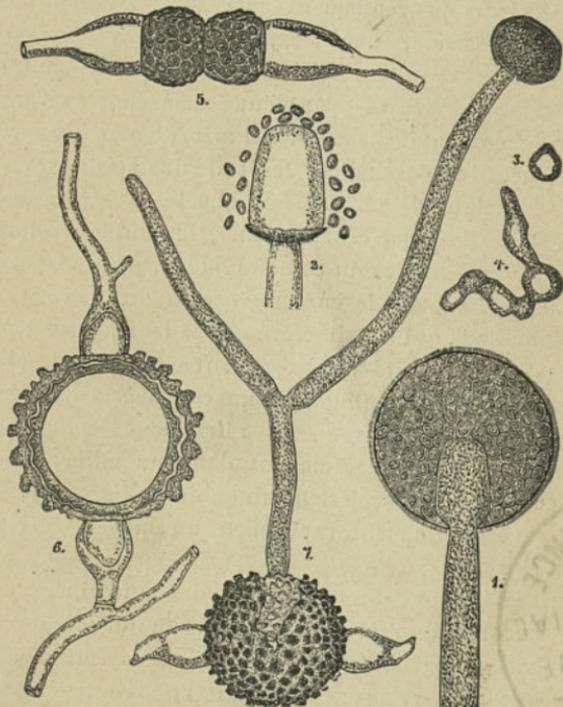
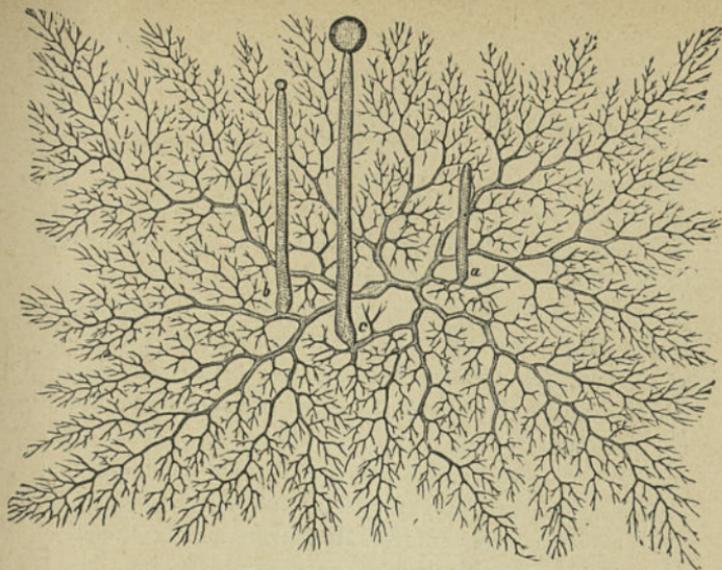


FIG. 29.

Mucor Mucedo, d'après *Brefeld et Kny*.

A Mycélium ramifié en forme d'arbre avec des branches assez épaisses isolées, perpendiculaires (a, b, c), 1 sporange, 2 columelle et spores, 3, 4 spores en germination, 5, 6 développement de la zygospore, 7 zygosporangium en germination avec sporange.

transparent, formant à la surface et à l'intérieur du milieu nourricier, de nombreuses ramifications très fines. Ce mycélium reste sans cloisons dans les premières phases du développement, jusqu'au commencement de la formation des sporanges, c'est-à-dire qu'il est unicellulaire. De ce mycélium s'élèvent des rameaux simples, vigoureux, les tubes sporangifères; les extrémités de ces rameaux qui, d'après Zopf, contiennent une matière colorante grasse d'un jaune rougeâtre, se gonflent fortement, et sous ce renflement, il se forme finalement une cloison qui sépare le sporange du tube sporangifère. La cloison se recourbe vers le haut et forme une " columelle " à l'intérieur du renflement sphérique, ce qui donne à l'espace intérieur une forme particulière (1). Le protoplasma de cet espace se divise en un grand nombre de particules qui s'enveloppent d'une membrane en s'arrondissant: ce sont les spores. En même temps, la surface extérieure du sporange se revêt de fins cristaux aciculaires d'oxalate de chaux. Dès que le sporange noir a mûri et qu'il prend de l'humidité, la paroi se dissout et les spores, munies du contenu jaune, sont dispersées de tous côtés avec le contenu gonflé du sporange. La " columelle ", qui s'était élevée dans le fruit, se trouve encore à l'extrémité du tube sporangifère. Celle-ci est maintenant encore entourée d'un col, débris de la paroi du sporange (2). Les spores réfringentes enflent très fortement lorsqu'elles tombent dans un milieu nourricier convenable et projettent un ou deux fils germinatifs (3, 4) qui développent rapidement un mycélium vigoureux.

Outre ce mode de reproduction, les mucorinées montrent encore une reproduction sexuelle qui a lieu par la conjugaison de deux rameaux du même mycélium. Deux de ces courts rameaux croissant l'un contre l'autre, abondamment pourvus de plasma, forment des renfle-

ments claviformes et se touchent par leurs extrémités qui s'aplatissent (5). Chacun de ces rameaux est alors divisé en deux cellules par une cloison transversale, et les cellules extrêmes (cellules conjuguées), qui sont en contact, se fusionnent par la dissolution de la cloison originale double qui les séparait. Les deux cellules conjuguées sont ou d'égale grandeur, comme c'est le cas chez le *Mucor mucedo*, ou inégales, comme chez le *Mucor stolonifer*. La nouvelle cellule ainsi formée, la *zygospore* (6), augmente rapidement de volume, se gonfle en forme de boule (chez le *Mucor stolonifer* en forme de baril), et la cloison devient épaisse et stratifiée : à l'extérieur, elle est foncée et munie d'excroissances verruqueuses. Ces couches extérieures sont très réfractaires à l'action des acides. Le contenu est riche en substances de réserve (graisse). Les *zygospores* ne peuvent généralement germer qu'après un temps de repos assez long ; le tube mycélien qui a poussé au travers des couches extérieures, développe immédiatement les sporanges qui ont été décrits (7). Nous trouvons donc dans la *zygospore* un *état de repos* de la plante et un organe permettant, par sa structure, à la moisissure de pourvoir à son existence pendant des périodes qui seraient défavorables à son développement.

Les principaux caractères morphologiques indiqués plus haut se retrouvent aussi dans les espèces suivantes :

Mucor racemosus, qui se trouve sous des formes très variées principalement sur le pain et sur des débris végétaux en décomposition, a des filaments sporangifères ramifiés, multicellulaires, pouvant également atteindre une hauteur considérable. Aux extrémités des rameaux se développent les sporanges brunâtres. Les spores sont incolores. Quand on cultive ce champignon dans du moût, le mycélium submergé enfle irrégulièrement ; il se forme beaucoup de cloisons détachant de grosses cellules

en forme de baril ou irrégulières, remplies de plasma réfringent. Ces cellules (*gemmes*) se séparent facilement; elles prennent alors, comme *Bail* l'observa en premier lieu, la forme de boules (voir Fig 30⁷) et se multiplient ensuite par bourgeonnement, comme les cellules de levure proprement dites; la même chose a lieu pour les spores submergées (*levure mucor*, *levure sphérique*). Lorsque les gemmes sont ramenées à la surface du liquide, elles peuvent de nouveau produire la forme de moisissure. Il se produit aussi des formations gemmiformes, lorsque le mycélium est cultivé sur des corps solides et dans des milieux épuisés. Le plasma des filaments s'accumule dans certaines places en masses compactes et il est alors isolé des deux côtés par une cloison transversale. En même temps la cellule se gonfle, les parois s'épaississent et à l'intérieur viennent s'emmagasiner des substances grasses. Les parties des fils mycéliens placées entre les cellules perdent peu à peu leur contenu.

Mucor erectus se développe par exemple sur des pommes de terre pourries et offre, vu au microscope, tout à fait la même structure que le *Mucor racemosus*, mais il en diffère physiologiquement (voir plus loin).

Mucor circinelloïdes (Fig 30) a un aspect très caractéristique. Le mycélium (*1*) a une ramification particulière qui se trouve chez quelques mucorinées. Les branches principales (*b*) déploient des rameaux latéraux courts, radicellaires, fourchus en plusieurs points (*c*); de leur base partent de nouveaux rameaux mycéliens (*r*) qui s'élèvent et peuvent développer des sporanges (2-3); les filaments sporangifères sont ramifiés. Pendant leur développement, on les voit former de fortes courbes, auxquelles la plante doit le nom de circinelloïdes. Chez cette espèce comme chez le *Mucor spinosus* — dont les sporanges brun chocolat se distinguent par leur columelle munie à son extrémité supérieure d'excroissances pointues et

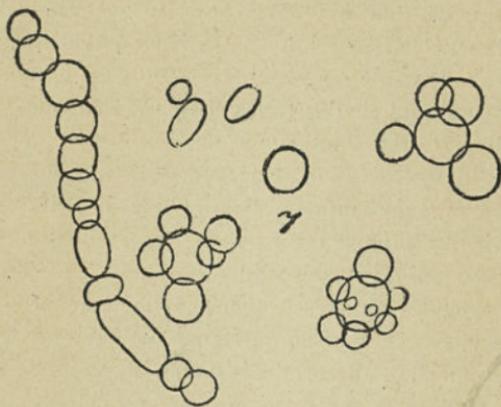
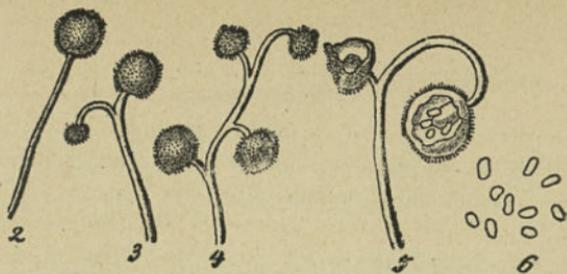


FIG. 30.

Mucor circinelloides d'après van Tieghem et Gayon.

- 1 Mycélium; b branche principale, c rameaux radicellaires; 2-4 développement de sporanges; 5 sporanges ouverts; 6 spores; 7 mycélium submerge et cellules bourgeonnantes.

épineuses, — le mycélium produit les mêmes développements gemmiformes que chez le *Mucor racemosus* et le *Mucor erectus*, lorsqu'il est submergé dans un liquide sucré.

Mucor stolonifer (*Rhizopus nigricans*) atteint une grandeur considérable et se présente très généralement, par exemple sur les fruits juteux. On reconnaît facilement ce champignon, parce que son mycélium brun-jaune pousse obliquement en l'air des tubes épais sans cloisons. Ceux-ci atteignent une longueur d'environ 1 c/m, puis leur pointe s'incline vers le substratum et ils développent des tubes *grêles*, abondamment ramifiés, qui poussent comme des radicules dans le milieu nourricier, tandis que d'autres tubes s'élèvent perpendiculairement en produisant des sporanges. D'autres branches forment ensuite de nouveau stolons. Le sporange noir possède une haute columelle en forme de dôme et développe un grand nombre de spores d'un brun foncé, rondes ou anguleuses. Lorsque ces dernières sont devenues libres par la résorption de la membrane du sporange, la columelle se retourne comme un parapluie sur le tube sporangifère, auquel la ligne de jonction reste visible sous forme d'une petite collerette. Chez cette espèce, on n'a pas observé la formation de chlamydospores.

Les mucorinées présentent, à notre point de vue, un intérêt tout particulier, parce qu'elles sont capables d'agir à des degrés différents comme *ferments alcooliques*.

Mais l'activité fermentative ne se rattache pas exclusivement aux développements gemmiformes bourgeonnants mentionnés plus haut, car ceux-ci n'ont pas été observés ni chez le *Mucor mucedo*, ni chez le *Mucor stolonifer*.

D'après les recherches de Hansen, les mucorinées, tant qu'elles sont du moins à considérer comme des ferments alcooliques provoquent une fermentation non

seulement dans des solutions de dextrose et de sucre interverti, mais encore dans celles de la maltose. Parmi les espèces étudiées par lui, il n'y a que le *Mucor racemosus* qui soit capable d'invertir une solution de sucre de canne ; les autres ne peuvent, par conséquent, pas provoquer de fermentation dans cette même solution.

Le *Mucor erectus* possède la plus vigoureuse puissance fermentative. Dans du moût de bière de concentration ordinaire — 14 à 15° Balling — il forme jusqu'à 8 0/0 d'alcool en volume. Il provoque aussi une fermentation alcoolique dans des solutions de dextrine et transforme l'amidon en sucre réductif. Le *Mucor spinosus* forma dans du moût de bière jusqu'à 5,5 0/0 d'alcool en volume ; dans une solution de maltose on observa des phénomènes de fermentation manifestes, et au bout de huit mois, le liquide contenait 3,4 0/0 d'alcool en volume. Le *Mucor mucedo* fait voir une puissance fermentative relativement faible, tant dans le moût (jusqu'à 3 0/0 d'alcool en volume) que dans des solutions de maltose et de dextrose. Le *Mucor racemosus* forme dans le moût jusqu'à 7 0/0 d'alcool en volume ; il développe de l'invertase et fait fermenter le sucre de canne interverti ; cette espèce se distingue par là, comme on l'a dit plus haut, de toutes les autres mucorinées.

D'après Gayon, le *Mucor circinelloïdes* est sans effet sur le sucre de canne, tandis qu'il exerce une action fermentative très prononcée sur le sucre interverti (5,5 0/0 d'alcool en volume). Gayon en conclut que ce champignon pouvait être employé avec avantage dans les raffineries, pour extraire le sucre de canne des mélasses. Autant que nous avons pu nous en informer, cette observation n'a pas été utilisée en pratique.

Il faut encore compter parmi ce groupe le *Mucor Amylomyces Rouxii*, décrit par Calmette et Eijkmann, qui se présente dans la levure dite chinoise, de petits gâteaux

gris-blanc, consistant en grains de riz pétris avec différentes épices. Après avoir été broyés, ces gâteaux sont mélangés avec du riz cuit : la moisissure entoure bientôt tout le riz de son mycélium blanc. Peu à peu le riz se transforme en un liquide jaunâtre, renfermant de la glucose, produite par le ferment diastatique énergique du champignon qui possède également, comme toutes les mucorinées, un ferment alcoolique.

Le *Chlamydomucor Oryzæ*, décrit par *Went* et *Prinsen Geerligs*, qui est à peu près identique avec l'espèce précédente, contient des ferments diastatiques analogues. Il est employé à Java dans la fermentation de l'arack.

6. — *Monilia*.

Sous le nom de *Monilia* (Fig. 31 et 32) on trouve dans les ouvrages traitant de la mycologie, la description d'un grand nombre de moisissures différentes d'une structure relativement simple. D'un mycélium qui varie de couleur selon les espèces s'élèvent des branches dont se détachent des séries de spores ovoïdes ou elliptiques. Ce genre de moisissures a attiré notre attention, parce qu'une de ses espèces que *Hansen* avait nommée provisoirement *Monilia candida*, d'après la description de *Bonorden* offre, au point de vue physiologique, des propriétés remarquables. Elle apparaît dans la nature comme une couche blanche sur du fumier de vache frais et sur des fruits doux et juteux. Transportée dans du moût, elle donne lieu à une abondante végétation de cellules ayant l'aspect de levure et ressemblant au *Saccharomyces ellipsoïdeus* ou *ce-revisiæ*. Elle provoque en même temps une forte fermentation alcoolique et couvre le liquide, pendant que celle-ci est encore en activité, d'un voile mycodermique. Dans

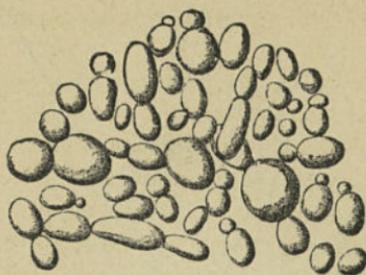


FIG. 31. - A.

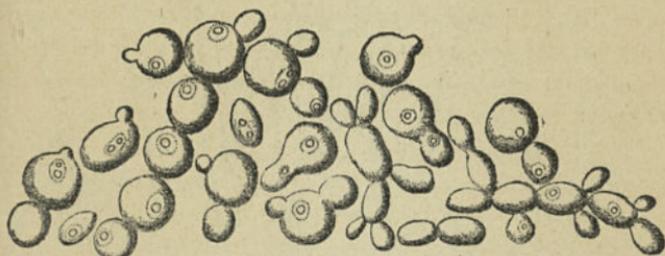


FIG. 31. - B.

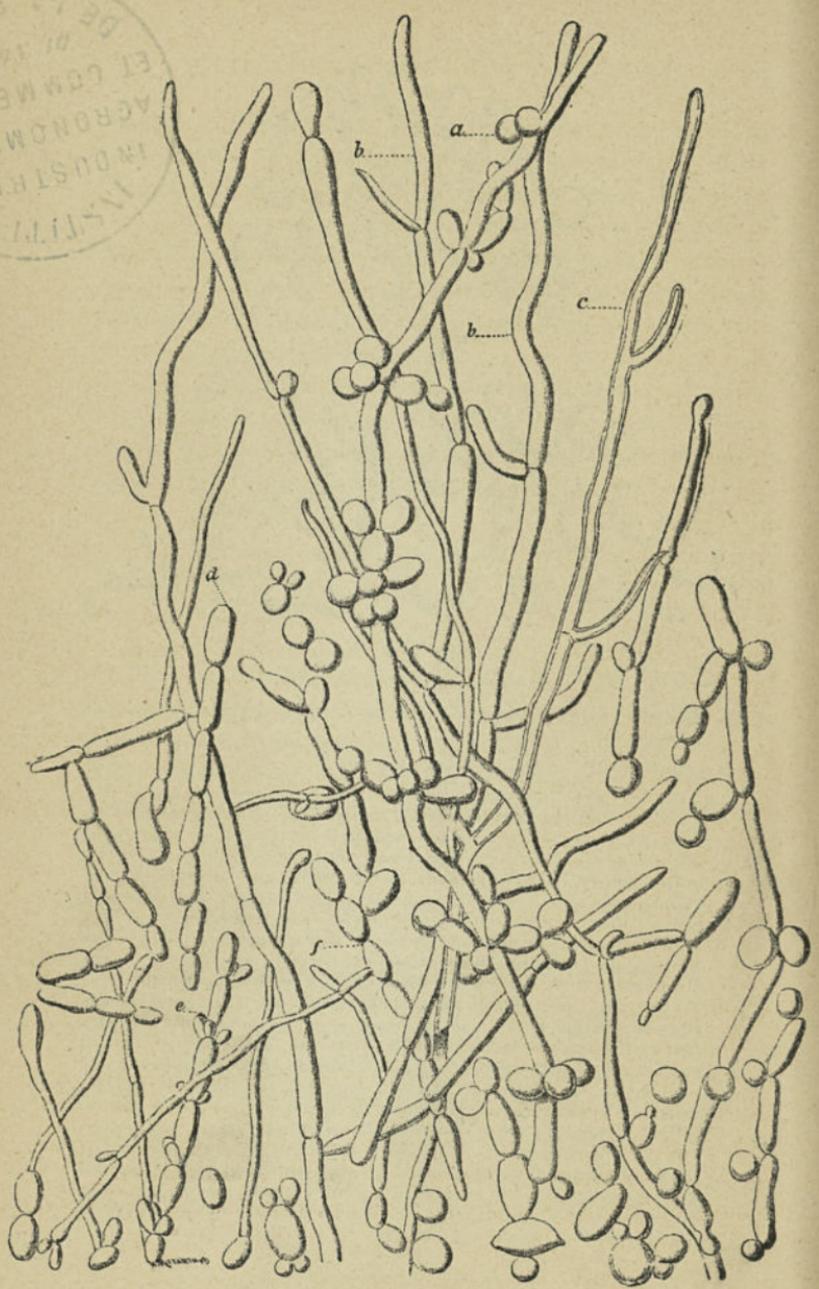
Monilia candida d'après Hansen.

A Végétation dans du moût de bière ou d'autres liquides nourriciers sucrés.

B Cellules d'une jeune formation de voiles.

Fig. 32. — C Végétation des moisissures. Les formes comme **a** sont fréquentes ; elles se composent de chaînes de cellules allongées, plus ou moins filiformes, et assez faiblement reliées entre elles : à chaque articulation se trouve ordinairement une couronne de cellules de levure ovales, qui tombent facilement. **b** représente une autre forme fréquente mais qui se distingue de la précédente par l'absence des cellules disposées en couronne, lesquelles sont remplacées par une branche analogue à celle qui forme la tige mère, mais plus courte. Il n'est pas rare que les articles qui forment ces chaînes soient étroitement unis entre eux. Les étranglements disparaissent dans beaucoup de cas et il naît un mycélium tout à fait typique avec des cloisons distinctes (**c**). Les formes **b** et **c** se trouvent dans le milieu nourricier, **a** ordinairement à la surface. Les formes comme **d** ont beaucoup de ressemblances avec l'*Oidium lactis*. **e** nous montre une chaîne de cellules pyriformes avec des couronnes de cellules de levure ressemblant au *saccharomyces exiguus*. La chaîne de cellules en forme de citron représentée par **f** correspond exactement aux dessins d'Ehrenberg de l'*Oidium fructigenum*. On trouve parmi les formes principales décrites de nombreuses cellules de levure de différentes formes et réunies en colonies différemment groupées. Comme c'est ordinairement le cas, il s'en présente aussi comme le *Saccharomyces conglomeratus* Rees.

INSTITUT
INDUSTRIEL
AGRONOMIQUE
ET COMMERCIAL
DE L'ÉCOLE



· FIG. 32. — C

ce voile les cellules s'allongent de plus en plus pour former finalement un véritable mycélium. Pendant la première période, cet organisme ne forma que 1,1 0/0 d'alcool en volume, tandis que le *Saccharomyces cerevisiæ* en formait 6 0/0 ; mais la *Monilia* continua la fermentation tandis que la levure de culture s'arrêta à cette quantité. Au bout de six mois, la *Monilia* avait formé 5 0/0 d'alcool en volume.

D'après les recherches de *Hansen*, la *Monilia* ne sécrète pas de l'invertine, tout en faisant fermenter le sucre de canne ; il en conclut que le sucre de canne est directement fermentescible. Cependant il indique lui-même la possibilité qu'à l'intérieur des cellules le sucre de canne soit transformé en sucre inverti, qui serait immédiatement consommé.

Fischer et *Lindner* constatèrent par des analyses chimiques, qu'aucune substance hydrolysante du sucre de canne ne pouvait être extraite, ni de la végétation fraîche ni de la végétation sèche. Mais les auteurs cités purent intervertir le sucre de canne en employant le champignon séché, même en présence d'agents anesthésiques, ainsi que par l'emploi de la végétation fraîche, où les cellules avaient été en partie rompues par le broyage avec de la poudre de verre. Ces observateurs en concluent qu'un enzyme intervertissant, insoluble dans l'eau, formait une partie du plasma vivant et que, probablement aussi chez la *Monilia*, la fermentation du sucre de canne n'avait lieu qu'après inversion préalable. On n'a donc toujours pas encore réussi à obtenir ce ferment.

Suivant *Fischer*, la maltose est dédoublée, non seulement par la *Monilia* fraîche ou séchée, mais encore par un extrait aqueux de la végétation sèche, ce qui fait supposer à l'auteur que cette moisissure contenait de la *maltase*, ce nouvel enzyme qu'il a découvert récemment dans le *Saccharomyces cerevisiæ*.

Suivant *Bau* la *Monilia* fait aussi fermenter la dextrine produite par la diastase.

En 1883, la *Monilia* était encore considérée comme le seul champignon pouvant faire fermenter le sucre de canne sans sécrétion d'invertine. Plus tard, *Zopf*, *Beijerink*, *Behrens* et d'autres chercheurs ont observé, chez quelques autres microorganismes, ce phénomène d'ailleurs rare, qui nous offre le plus grand intérêt, parce qu'il nous montre que, dans ce domaine, il existe également des gradations dans la nature.

Les liquides fermentés par la *Monilia* accusent aussi, pendant la fermentation, la présence d'acide carbonique et d'alcool éthylique.

Enfin il faut encore ajouter que cette moisissure se distingue par la facilité avec laquelle elle supporte les températures élevées. Dans du moût de bière et dans des solutions nourricières de sucre de canne, elle se développe vigoureusement à 40° C. et provoque, à cette température, une fermentation énergique.

7. — *Oidium lactis*.

Une moisissure qui a joué un rôle important dans la littérature de la physiologie de la fermentation et dans la littérature médicale, c'est l'*Oidium lactis* (Fig. 33) ou « levure de l'acide lactique ».

Une partie de ces communications a pour but de démontrer que cette moisissure ne représente qu'une phase du développement de certaines espèces qui, dans d'autres circonstances, apparaissent sous des formes et avec des propriétés absolument différentes. Elle fut mise ainsi en rapport génétique avec des bactéries, avec la *Chalara*

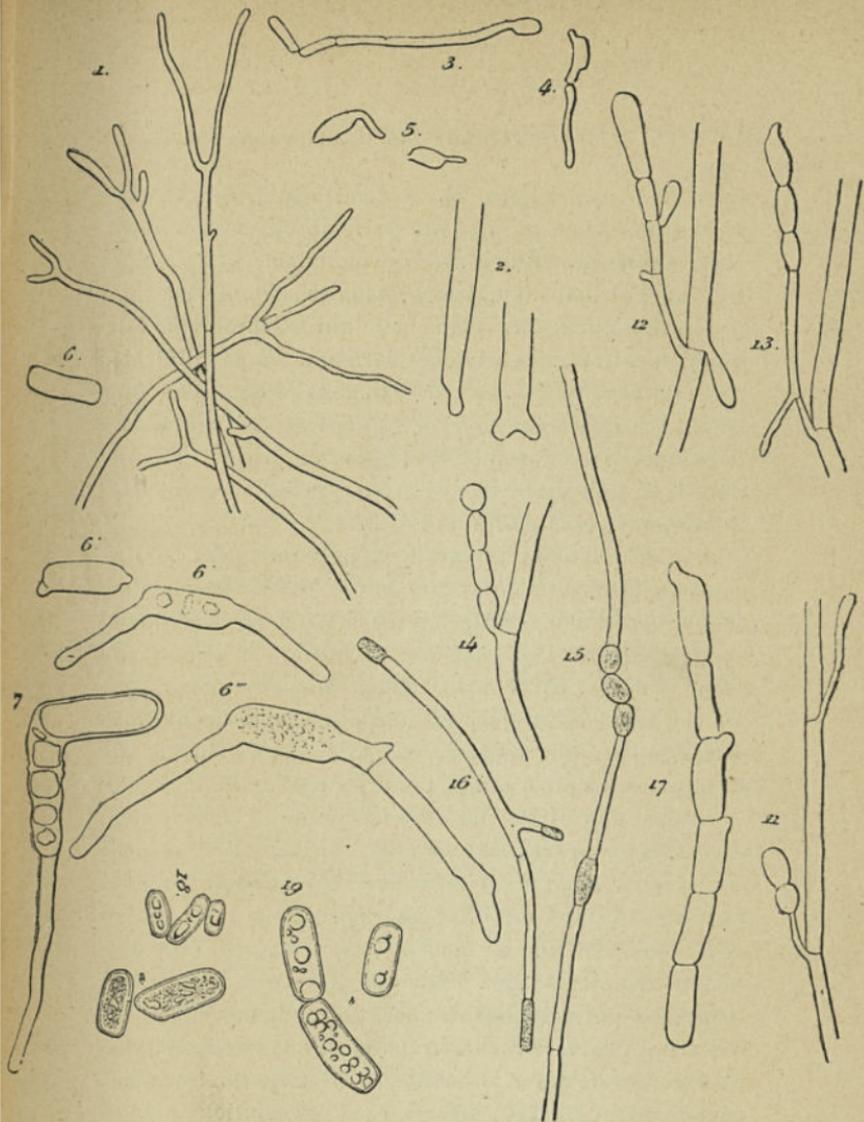


FIG. 33.

Oidium lactis, d'après Hansen.

- 1 Filaments fourchus à leur sommet. 2 Deux extrémités de filaments, dont l'une montre une dichotomie à son début et l'autre commençant à détacher un article sphérique. 3-7 Conidies en germination. 6-6''' La germination d'une conidie inoculée dans du moût de bière houblonnée, dans la chambre humide de *Ranvier*, représentée dans plusieurs états de développement. Chaque extrémité a produit des tubes germinatifs; au bout de 9 heures (6'''), les fils germinatifs se sont cloisonnés et ont formé les premières traces de ramification. 11-14 Formes anormales. 15, 16 Filaments avec cellules interstitielles remplies de plasma. 17 Chaîne de conidies en train de germer. 18 Conidies qui ont séjourné longtemps dans de l'eau sucrée; le contenu montre des gouttes huileuses. 19 Vieilles conidies.

(voir plus loin), avec les *Saccharomyces*, etc. Brefeld, ainsi que Hansen, ont exécuté de nombreuses expériences et des essais de culture avec cet organisme, et ils les ont continués pendant longtemps, sans cependant réussir à produire d'autre forme que celle qui est propre à l'*Oïdium*. Il est vrai que dans ces derniers temps, Brefeld a observé chez plusieurs champignons d'un ordre plus élevé, une formation de conidies apparaissant en chaînes oïdiennes. Il n'a jusqu'à présent pas été établi, si parmi ceux-là se trouvait aussi compris l'espèce que nous désignons par le nom d'*Oidium lactis*.

Fresenius donna avec raison à ce champignon le surnom de *lactis* (du lait); car toutes les expériences ont jusqu'à présent démontré qu'il avait son siège ordinaire dans le lait, où l'on peut le rencontrer la plupart du temps. On n'a, par contre, fourni aucune preuve pour que cette moisissure joue un rôle dans les fermentations acides du lait. Elle apparaît en outre spontanément sur les liquides les plus variés, entre autres sur les mélanges sucrés que l'on utilise dans l'industrie de la fermentation et elle peut y provoquer une faible fermentation alcoolique. D'après *Lang* et *Freudenreich*, elle produit au bout d'environ 10 jours, dans des solutions de sucre, de lait ou de glucose, 0,35 0/0, au bout de cinq semaines, 1 0/0 d'alcool en volume. De plus petits volumes d'alcool sont formés dans des solutions de sucre de canne ou de maltose. Ces mêmes auteurs constatèrent aussi que ce champignon possède à haut degré la faculté de décomposer les matières albuminoïdes. Les cultures dans des solutions nourricières de lactose dégagent une forte odeur de fromage mou (de Limbourg) et l'*Oïdium* joue sans doute un rôle dans la maturation de cette sorte de fromage.

Les filaments (Fig 33, 1) souvent fourchus, rameux, à parois minces, transparents, forment comme une couche de feutre épaisse et blanche. Dans la partie supérieure

des filaments, il se forme des cloisons très rapprochées, après quoi les cellules remplies d'un plasma très réfringent se détachent comme conidies (Fig. 33, 3-7, 11-14, 17-19).

En coupe longitudinale, les conidies se présentent généralement sous une forme rectangulaire à coins arrondis (fig. 33, 3, 6, 17-19); on trouve cependant presque toujours dans une végétation de cette moisissure en même temps des conidies sphériques, ovales, pyriformes ou tout à fait irrégulières (Fig. 33, 4, 5, 11-14). De ces organes reproducteurs, les seuls connus, sortent un ou deux fils germinatifs. Quand le champignon croît sur un milieu solide, les filaments se rejoignent en formant de bizarres corps coniques.

Ce champignon peut survenir dans la bière, surtout quand elle est pauvre en alcool. Dès que la quantité d'alcool augmente, les conditions de développement deviennent moins favorables. Cependant ni le moût ni la bière ne sont exposés à être sensiblement attaqués par l'Oidium, attendu que celui-ci n'est pas capable de lutter avec les organismes concurrents, qui apparaissent aussitôt que des liquides fermentescibles sont exposés aux germes suspendus dans l'air.

Dans nos nombreuses études sur la levure haute, nous avons observé que la moisissure en question y trouvait un milieu nourricier très favorable, surtout lorsque la levure était en repos, la fermentation principale une fois terminée. Quelquefois l'examen microscopique révéla la présence d'un nombre énorme de ses conidies. On ne connaît pas l'influence d'une telle végétation sur la qualité de la levure ou de la bière; il est sans doute prudent d'éviter ce champignon autant que possible.

8. La coloration rouge qui se voit quelquefois sur les grains de malt, provient de divers champignons, entre autres d'un *Fusarium*, dont *Mathews* et *Klein* nous ont

donné la description. La formation des moisissures commence à l'extrémité germinente du grain, d'où elle s'étend alors sur toute la surface. Les filaments du mycélium, qui ont des renflements sphériques, sont reliés par de nombreuses ramifications. La matière colorante rouge a son siège dans le contenu des filaments. Sur un milieu humide, les membranes se gonflent peu à peu, et forment une enveloppe mucilagineuse, colorée en violet par l'iode. Les conidies ovales germent directement ou bien elles développent d'abord des cellules falquées, à plusieurs articles, qui se dilatent peu à peu et dont les extrémités poussent des fils germinatifs. Le mycélium et les conidies falquées peuvent produire des cellules durables gemmiformes, à membrane épaisse. Ce champignon ne semble pas pouvoir entraver la germination des grains d'orge sains, même quand son mycélium envahit la surface. Il ne s'attaque ordinairement qu'aux grains malades.

9. *Chalara Mycoderma* (Fig. 34) est signalée dans les « *Études sur la bière* » de Pasteur, comme habitant les grains de raisin. Le mycélium forme un voile à la surface des liquides et consiste en filaments ramifiés, tirant sur le gris, souvent remplis d'un plasma très réfringent dont se détachent en divers points des conidies de forme et de grandeur inégales. *Cienkowski* a, dans son mémoire sur les champignons des voiles, donné la première description détaillée de la *Chalara*. *Hansen* observa que cette moisissure croissait sur le moût ordinaire et sur la bière de garde, même quand ces liquides sont dilués.

10. Une moisissure sur laquelle on a beaucoup écrit et qui se rattache à notre sujet, est le *Dematium pullulans* (Fig. 35), qui a été décrit en premier lieu par *de Bary*, et ensuite par *Law*. Il est surtout sur les fruits, principale-

ment sur les raisins et possède un mycélium rameux poussant des bourgeons qui ont une ressemblance frappante avec les cellules de levure ordinaires (4). Ces bourgeons peuvent, comme les levures, se propager à leur tour à travers plusieurs générations, de nouveau par bourgeonnement, ou bien former des fils germinatifs qui produisent un mycélium (3). Quand ce dernier a atteint un certain âge, il forme de nombreuses cloisons très rapprochées et devient peu à peu brunâtre ou vert-olive (5); ceci caractérise la phase de repos de la plante. Dans ses analyses d'air,

Hansen rencontra très fréquemment, depuis le printemps jusqu'à la fin de l'automne, le *Dematium* sur du moût exposé à l'air. Il observa

que lorsque ce champignon était semé dans des liquides sucrés, il ne développait au commencement que des fils mycéliens; mais au bout de quelque temps, les cellules

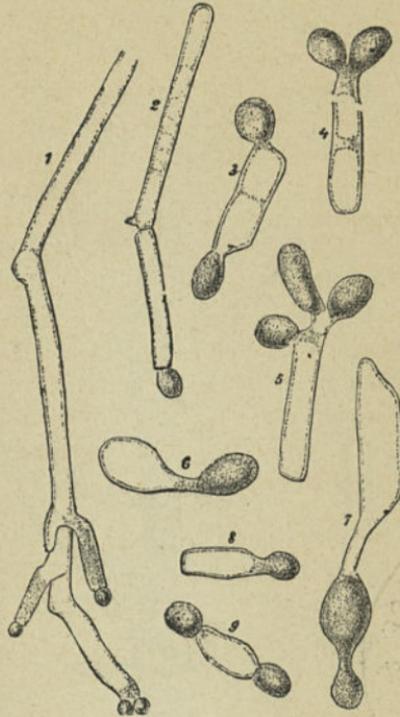


FIG. 34.

Chalara Mycoderma, d'après *Hansen*.

1 Filament ramifié, dont les articles terminaux se divisent en conidies; 2 Filament dont la cellule supérieure porte un stérigmate, ayant détaché des conidies; 3-9 Articles des filaments de différentes formes détachant des conidies.

qui ont l'aspect de levure, se détachent sans provoquer de fermentation alcoolique.

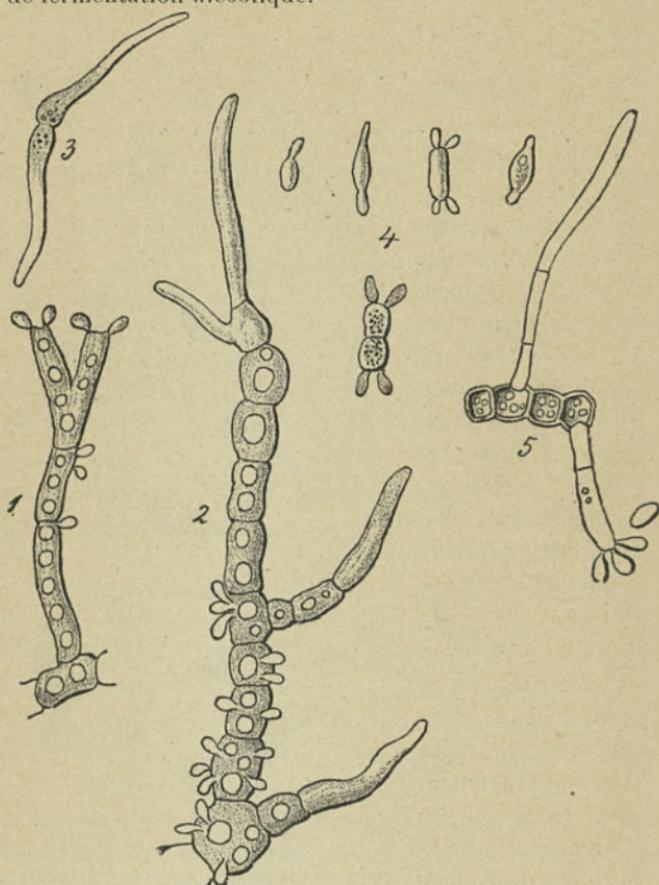


FIG. 35.

Dematium pullulans, d'après *Loew*.

1, 2 Filaments mycéliens arrivés au terme de leur croissance avec cellules ressemblant à des levures; 3 Cellules de cette dernière espèce se développant en fils mycéliens; 4 Cellules ressemblant à des levures en bourgeonnement; 5 Apparition de cellules ressemblant à des levures aux tubes germinatifs des cellules à parois brunes.

Récemment, l'auteur de ce livre, Just Chr. Holm,

Holm, Johan, Olsen et d'autres chercheurs ont découvert des espèces de *Dematium* à sporulation endogène développant des générations bourgeonnantes qui produisaient également des spores endogènes, c'est-à-dire des Saccharomycètes.

Lindner nous communique d'une espèce qu'elle rend le moût filant si elle se développe dans ce liquide.

11. Une moisissure pouvant se présenter dans des liquides fermentescibles et dans les caves de fermentation est le *Cladosporium herbarum*. Elle se présente quelquefois en très grande quantité dans les caves de fermentation. Il y a quelques années, nous avons trouvé le plafond et une partie des murs d'une cave de fermentation basse, recouverts d'une foule de petites taches noires. Celles-ci étaient formées par cette moisissure, c'est pourquoi nous en retrouvions toujours les conidies dans la levure. La plante est un mycélium jaune-brun avec des filaments courts, droits, raides et cassants, et ceux parmi ces derniers qui croissent en l'air, peuvent produire à leur extrémité supérieure des conidies de formes extrêmement variées; sphériques, ovales, cylindriques, droites ou recourbées. La classification systématique de ce champignon et son rapport génétique possible avec d'autres moisissures connues sont aussi peu établis que son influence sur le liquide nourricier. *Eriksson* indique que le seigle est quelquefois attaqué par le *Cladosporium*, et que cette moisissure, introduite par du pain ou de la bière provenant de seigle contaminé, pouvait produire des maladies chez l'homme.

Pour ce qui concerne cette forme ou d'autres formes analogues, *Zopf* donne des descriptions morphologiques détaillées, accompagnées de nombreuses illustrations, dans son mémoire sur le *Fumago* ainsi que dans son traité sur les champignons. Ceux de cette dernière espèce,

qui produisent la maladie appelée fumagine, apparaissent très fréquemment sur des végétaux. *Frank* dit avec raison que nous sommes encore complètement dans l'obscurité en ce qui concerne les différences spécifiques; la cause en est principalement dans le fréquent polymorphisme de ces organismes, et dans le fait que les diverses formes de développement ne se rencontrent presque jamais ensemble.

Parmi tous les champignons qui s'attaquent à la vigne, il existe deux parasites qui ont acquis une triste célébrité par les grands ravages qu'ils causent.

L'*Oidium (Erysiphe) Tuckeri* qui est la « véritable nielle » (*mal blanc* ou *meunier*), forme sur les feuilles et sur les pousses des ceps de vigne des taches blanchâtres qui deviennent plus tard brunâtres. Elles consistent en fils mycéliens qui détachent des conidies incolores, elliptiques ou oblongues, mesurant 8μ de longueur et 5μ d'épaisseur. Le mycélium s'étend sur les grains en les recouvrant d'un duvet gris et introduit des suçoirs dans leur enveloppe, ce qui amène la mort des cellules épidermiques. Lorsque la maladie s'attaque aux jeunes grains, l'épiderme n'arrive plus à suivre la croissance des parties internes, elle se rompt peu à peu en s'épaississant, le contenu en sort, et les grains se dessèchent ou ils pourrissent. Ils peuvent donner au vin un goût et une odeur très désagréables.

Les gros grains attaqués par ce champignon ne souffrent pas tant, mais sont néanmoins gênés dans leur maturation.

Le remède le plus efficace contre ce dangereux parasite, est le soufrage des vignes, qui n'agit cependant que lorsqu'il se fait par le beau temps.

Un autre champignon parasitaire de la vigne est la *fausse nielle (mildiou ou mildew) Peronospora viticola*, qui s'introduit dans l'intérieur des feuilles et des fruits où

il s'étend et tue les cellules. Les tubes conidifères émanent en forme de touffes des stomates des feuilles et des jeunes grains (Fig 36). Ils portent des ramifications dont

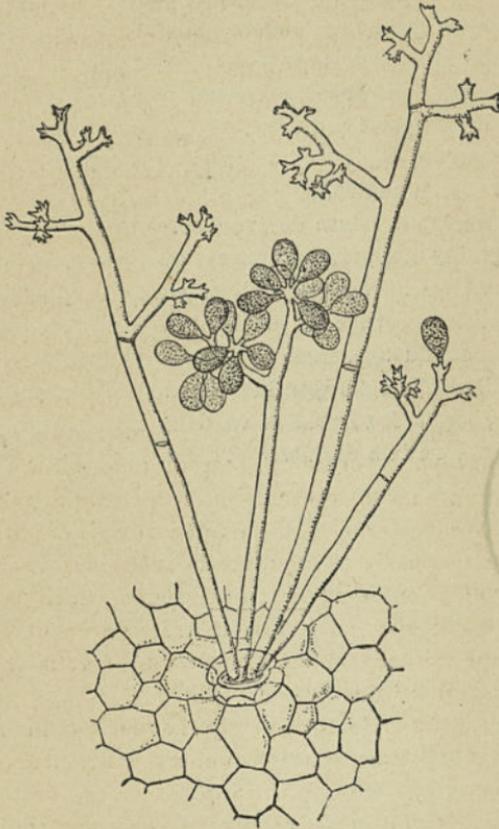


FIG. 36.

Peronospera viticola d'après Cornu.

les rameaux ainsi que l'axe principal se terminent en courtes pointes coniques. Les conidies sont ovoïdes, ont de 12 à 30 μ de longueur, et sont munies d'une membrane

incolore et unie. Dans les conidies se forment ordinairement 3 ou 6 sporidies qui sortent lorsque les conidies sont immergées dans de l'eau et s'introduisent par l'épiderme dans la plante. La végétation forme sur les feuilles et sur les grains des taches épaisses, hautes, blanchâtres. Dans l'intérieur de la plante se développent les grandes cospores sphériques, mesurant 30μ de diamètre, qui possèdent une paroi brunâtre, lisse ou peu froncée, et qui sont entourées de la mince paroi de l'oogone, qui est incolore ou jaunâtre.

Ce champignon cause de grands ravages, car, suivant que les grains attaqués sont jeunes ou plus avancés, ils se dessèchent ou ils pourrissent, et en outre il détruit le feuillage. Cette espèce est originaire d'Amérique et a été importée en Europe, en 1878, par des plants américains. Aujourd'hui elle est répandue dans tous les pays viticoles. On cherche à combattre ce dangereux parasite par l'emploi du sulfate de cuivre et d'autres moyens.

CHAPITRE V

LES FERMENTS ALCOOLIQUES

INTRODUCTION

Etant donné le cadre restreint d'un ouvrage du genre de celui-ci, il est impossible de faire un exposé historique et détaillé des connaissances des temps passés. On ne pourra traiter que de ce qui est absolument indispensable pour l'intelligence exacte de l'état actuel du sujet. Comme les travaux des dix dernières années avaient pour origine, d'une manière plus ou moins directe, des questions pratiques, les résultats obtenus sont tout naturellement appelés à être introduits dans la pratique et à y être utilisés. Ceci ne peut, il est évident, se réaliser que si *les points de vue essentiels* des travaux scientifiques ont été bien compris. Le but de l'exposé suivant est d'en faciliter l'intelligence.

Le terme « *ferments alcooliques* » employé dans son sens général, est très collectif. Les moisissures ainsi que les bactéries et les champignons bourgeonnants peuvent occasionner une fermentation alcoolique. Nous ne nous occuperons ici que de ces derniers. Parmi les *champignons bourgeonnants*, il existe *plusieurs espèces qui peuvent se présenter accompagnées d'un mycelium*, tandis qu'une telle forme de développement est dans la règle inconnue pour les autres espèces. Dans cette dernière catégorie de

champignons bourgeonnants on distingue de nouveau, sous le nom de SACCHAROMYCES, un groupe spécial pouvant former des spores endogènes.

Déjà en 1839, Schwann observa qu'à l'intérieur de certaines cellules de levure se formaient de nouvelles cellules qui devenaient libres par suite de la rupture de la membrane de la cellule-mère. C'est J. de Seynes qui, le premier, donna, en 1868, une description exacte des spores dans les cellules de levure. Peu après, en 1870, Reess constata cette même formation chez plusieurs espèces, et annonça que la germination de ces cellules avait lieu par bourgeonnement. Autant que les très imparfaites méthodes d'investigation de l'époque le permettaient, on admit comme probable l'existence d'un groupe indépendant de ces champignons bourgeonnants. Reess désigna ce groupe par le nom générique de *Saccharomyces*. (Il comprit dans ce genre, et cela avec bien moins de conséquence, des espèces ne formant pas de spores, et il fut suivi sur cette voie par de Bary, qui écrivit une « Morphologie et biologie comparée des champignons » 1884. Reess renversa ainsi lui-même immédiatement la classification systématique qu'il venait d'entreprendre). Les conditions dans lesquelles de tels organes de reproduction apparaissaient dans les cellules, n'étaient cependant pas connues; les expériences s'exécutaient au hasard, sans méthode déterminée. Dans l'ouvrage mentionné, Reess indiqua un système de classification des *Saccharomyces* qui ne se base que sur les dimensions et sur les formes des cellules. Une telle classification en espèces, ne reposant que sur des caractères microscopiques, a été reconnue sans valeur aucune; il est donc impossible de distinguer les espèces par les caractères qu'indique Reess. Ses travaux ne purent par conséquent obtenir une valeur vraiment pratique. Comme les conditions essentielles pour la production de la sporulation lui restèrent autant

inconnues qu'à son successeur *Engel*, et que cela dépendait du hasard, si l'on obtenait ou non des cellules en sporulation dans une culture de *Saccharomyces*. on comprendra facilement pourquoi, dans les années suivantes, l'existence de spores fut mise en doute, et pourquoi on arriva à discuter la question de savoir si les races employées dans la pratique avaient ou non perdu leur propriété de former des spores intérieures. *Brefeld* crut enfin pouvoir affirmer que cette propriété faisait entièrement défaut dans la levure de culture. On ne sortit de cette confusion que lorsque *Hansen* eut trouvé les *lois de la sporulation* et qu'il eût basé sur elles une méthode.

Les « *Études sur la bière* » de *Pasteur* parurent en 1876. Ce livre a, sous plusieurs rapports, enrichi nos connaissances des phénomènes se rattachant à la fermentation. L'opinion déjà fortement soutenue par lui dans ses écrits précédents, savoir, que toute fermentation et toute pourriture était suscitée par des microorganismes, forme le contenu principal de son ouvrage. C'est avec raison qu'on associa le nom de *Pasteur* à cette doctrine importante, car c'est principalement par ses recherches que cette doctrine fut fondée et rendue appréciable. Nous pouvons suivre les traces des idées qui y conduisirent, en remontant bien des années. Déjà du temps de *Linné*, plusieurs savants, parmi lesquels *Linné* lui-même, étaient d'avis que tout procès de fermentation ou de putréfaction était causé par des organismes microscopiques ; mais ce n'est que plus tard qu'on put en fournir les preuves. Ainsi qu'il a été dit plus haut, *Mitscherlich* et plus tard *Cagniard Latour* démontrèrent, en 1835, que les levures de bière et de vin se composaient de cellules se reproduisant par bourgeonnement, et que ces cellules provoquaient la fermentation alcoolique. Peu après, *Schümann* arriva au même résultat. Déjà, en 1838, l'idée fut exprimée que les

différentes fermentations étaient provoquées par différents microorganismes. *Turpin* prononça, à cette époque, la proposition suivante : « Point de décomposition de sucre, point de fermentation sans l'acte physiologique d'une végétation. » Je renvoie d'ailleurs à l'exposé de ce principe qui a été fait précédemment (page 12) et qui se rattache, dans le développement historique, exactement à la théorie de la génération spontanée.

Des découvertes importantes ne sont jamais l'œuvre d'un seul homme, elles sont bien plutôt le résultat des travaux de plusieurs chercheurs ; or, il est en général beaucoup plus facile d'exprimer l'idée d'une vérité quelconque que d'en fournir les preuves suffisantes. Quoique les principes fussent déjà connus, lorsque *Pasteur* commença ses recherches en 1837, plusieurs points essentiels faisaient encore défaut ; cela se voit surtout dans le fait que *Liebig* put encore citer les expériences de *Stahl*, pour expliquer les phénomènes de la fermentation par des transformations purement chimiques. La victoire que *Pasteur* remporta dans cette controverse a été le fondement de sa célébrité.

Dans les « *Études sur la bière* », il est clairement et incontestablement démontré *quelle puissance les êtres microscopiques possèdent*, et *Pasteur* fait ressortir que les *bactéries* peuvent exercer une influence décisive sur la marche de la fermentation alcoolique et sur le caractère de la bière. Les levures y sont également traitées. Pour quelques espèces de ce groupe, qui ne sont décrites qu'avec moins de détails, il est indiqué, comme cela a déjà été fait par *Bail* et par quelques autres zymotechniciens, qu'elles peuvent agir différemment sur la nature du produit de la fermentation. Ce que *Pasteur* mentionne ici, n'est cependant que la répétition des opinions peu claires de ses devanciers, et *ses indications divergent en deux sens opposés*. Cela apparaît clairement, par exemple, dans ses

observations sur la levure dite caséuse et sur la levure aérobie. Peut-être est-il question ici d'espèce de levures distinctes, particulières, mais peut-être aussi seulement de formes modifiées par un certain traitement de la levure ordinaire de brasserie. Il ne faut cependant pas oublier qu'il indique lui-même quelle était la raison pour laquelle la question ne pouvait être élucidée. Cette raison est, *qu'à cette époque, il n'était pas possible de savoir si la levure avec laquelle on opérait se composait, des l'origine, d'une ou bien de plusieurs espèces; on n'avait pas encore découvert à cette époque de méthode exacte pour la culture pure des espèces de levure, comme il'a été déjà dit précédemment* (page 31 et les suivantes). On ne trouve donc pas dans cet ouvrage une *orientation* exacte dans ce monde des microorganismes; aucun passage de l'exposé de *Pasteur* ne nous indique, pour les levures, des *caractères* tels que l'on puisse baser sur eux une analyse. *Pasteur* considère tous les champignons bourgeonnants qui possèdent quelque peu la faculté de provoquer une fermentation alcoolique, comme des *Saccharomyces*; on ne sait jamais au juste s'il s'agit de véritable *Saccharomyces* ou d'autres champignons bourgeonnants. Ces levures qui, d'après notre système actuel de classification, se rangent dans des subdivisions très différentes, y sont désignées comme des phases de développement de moisissures semblables au *Dematium*, sans qu'il y ait des preuves à l'appui. *Pasteur* ne nous dit pas s'il existe ou non plusieurs variétés de ces champignons bourgeonnants (*Saccharomyces*, *Torula*, *Dematium*, etc.). Sa manière de résoudre les problèmes de *botanique* que nous venons d'indiquer, doit en somme être considérée comme erronée dans ses points essentiels.

Comme il ressort des explications précédentes, la cause qui empêcha cet ouvrage d'introduire dans la brasserie la réforme annoncée dans la préface, git avant tout dans

l'impossibilité où se trouvait alors la science, d'apporter de la clarté dans les rapports des différents ferments alcooliques entre eux pendant le procès de la fermentation. Pasteur ne pouvait donc, sur ce point, dépasser les suppositions indéterminées et les opinions contradictoires de ses devanciers. Si dans l'ouvrage mentionné, il donne (page 4-7) un aperçu des microorganismes qui occasionnent des maladies dans la bière, il n'est question, conformément à ce qui a été dit, que de bactéries, et cette opinion est encore partagée, en 1883, par *Düclaux*, ainsi que par tous les auteurs français, anglais et allemands. Se basant sur ces études, *Pasteur* recommande aux brasseurs de recourir à la purification de la levure pour la débarrasser des bactéries, par exemple en la cultivant dans une solution de sucre avec de l'acide tartrique, ou dans du moût avec un peu d'acide phénique (voir plus bas).

Contrairement à ces opinions, *Hansen* fit connaître en 1883, sa théorie que quelques-unes des maladies les plus dangereuses et les plus fréquentes de la bière de fermentation basse provenaient, non pas de bactéries, mais de certaines espèces de *Saccharomyces*, et que chacun des noms employés par *Reess*: *Saccharomyces cerevisiæ*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces ellipsoïdeus*, désignaient non seulement une, mais plusieurs espèces et races distinctes. *Hansen* démontra que les espèces que l'on avait comprises à tort sous le nom systématique de *Saccharomyces cerevisiæ*, donnaient lieu, dans les brasseries, à des produits de natures différentes. C'est sur cette base que *Hansen* établit son système, d'après lequel on emploie un levain qui ne se compose que d'une seule espèce.

Après quelque opposition, ce système fut reconnu bon et introduit dans la pratique industrielle de tous les pays où l'on fabrique de la bière. Il y a quelques années (1887-89), cependant, *M. Velten*, à Marseille, collaborateur de

Pasteur, a attaqué ce système en prétendant que c'était précisément un défaut de la levure de *Hansen* qu'elle ne se compose que d'une seule espèce ou race ; tandis qu'il fait ressortir comme un avantage de la levure de *Pasteur*, qu'elle se compose, après la purification décrite ci-dessus, non pas d'une seule, mais de plusieurs races de levures de différente nature. Il considère ce mélange de différentes races comme nécessaire, pour que la bière puisse conserver le goût et le bouquet désirables. Il ressort des recherches de *Hansen* combien cette affirmation est erronée (voir page 34 et chapitre VI, 3). L'examen expérimental qu'il entreprit montra que le traitement de la masse de levure par l'acide tartrique, d'après la méthode de *Pasteur*, favorise le développement des levures de maladie à un tel point que celles-ci prennent finalement le dessus sur la levure de culture proprement dite. Aussi *Pasteur* salua-t-il le système de *Hansen* comme un progrès réel lorsqu'il écrivit : « M. *Hansen* a, le premier, bien compris que la levure de bière de consommation devait être pure, non seulement sous le rapport des microbes, ferments et maladies proprement dites, mais qu'elle devait être privée des cellules de levures sauvages » (1).

Non seulement l'ouvrage de *Pasteur* conserve-t-il toujours son importance pratique à cause de la puissance avec laquelle l'importance des bactéries pour l'industrie des fermentations y est démontrée, mais il offre également un grand intérêt au point de vue scientifique, particulièrement par la nouvelle théorie de la fermentation qui y est développée et qui, avec raison, fit sensation à l'époque.

Contrairement à *Brefeld*, qui prétendait que la levure

(1) *Bulletin de la Société d'Encouragement pour l'Industrie nationale*, janvier 1897, p. 43.

ne pouvait pas croître sans oxygène libre, et contrairement à *Traube* (1858) qui, en convenant bien que la levure pouvait se développer sans oxygène libre, soutenait que dans ce cas elle absorbait les albuminoïdes dissous dans le liquide, pour former des cellules, et que le travail fermentaire de la cellule de levure était dû à l'intervention d'un composé chimique, d'un enzyme, contenu dans le plasma, *Pasteur* établit que les organismes de la fermentation forment une colonie d'êtres vivants dont les fonctions fermentatives sont précisément « une conséquence nécessaire de la vie sans air, de la vie sans oxygène libre ». En outre il établit qu'une fermentation semblable peut se produire aussi dans des solutions sucrées pures. Il maintient que la cause pour laquelle *Brefeld* ne put parvenir à développer de la levure dans la chambre humide dans une atmosphère d'acide carbonique, était qu'il opérait avec de vieilles cellules de levure, tandis que l'accroissement de la levure sans oxygène libre n'est possible que lorsque les cellules sont très jeunes. La petite quantité d'oxygène libre qui se trouve dans les liquides auxquels la levure est ajoutée « rajeunit les cellules et leur permet de reprendre la faculté de bourgeonner, de poursuivre leur vie et de continuer leur multiplication à l'abri de l'air ».

Pasteur fait donc, comme cela a été dit précédemment, une distinction entre deux espèces d'organismes : les *aérobies* qui ne peuvent vivre sans le contact de l'air, et les *anaérobies* qui peuvent se passer d'air ; ces derniers sont, d'après sa manière d'envisager les choses, « des ferments dans le sens propre du mot ».

Il serait faux d'admettre que la présence d'alcool et d'acide carbonique dans les produits d'une fermentation suppose nécessairement l'influence « d'organismes de fermentation alcoolique proprement dits ». Les expériences faites d'abord par *Lechartier* et *Bellamy*, et continuées

par *Pasteur*, ont démontré que lorsque des grains de raisin, des oranges ou d'autres fruits, sur lesquels ne se trouvaient pas de cellules de levure, étaient enfermés dans des vases remplis d'acide carbonique, il se produisait un développement d'acide carbonique et d'alcool. « Le caractère ferment n'est pas une condition de l'existence de la levure. La propriété ferment n'est donc pas inhérente à des cellules d'une nature spéciale. Ce n'est pas une propriété de structure permanente, comme, par exemple, celle d'être acide ou alcalin. C'est une propriété qui dépend de circonstances extérieures et d'un mode de nutrition de l'organisme » (*Études sur la bière*, page 258).

« En résumé, la fermentation est un phénomène très général. *C'est la vie sans air, c'est la vie sans oxygène libre*, ou, plus généralement encore, c'est la conséquence d'un travail chimique accompli au moyen d'une substance fermentescible capable de produire de la chaleur par sa décomposition, travail qui emprunte précisément la chaleur qu'il consomme à une partie de la chaleur que la décomposition de cette substance fermentescible met en liberté. La classe des fermentations proprement dites se trouve restreinte cependant par le petit nombre des substances capables de se décomposer avec production de chaleur et pouvant servir à l'alimentation des êtres inférieurs en dehors de la présence et de l'action de l'air » (*Études sur la bière*, page 261). Ceci est dans son essence, la célèbre théorie de la fermentation de *Pasteur*.

La fermentation par oxydation, par exemple celle de l'acide acétique, qui demande précisément, comme *Pasteur* l'a observé lui-même, que l'air soit présent en grande quantité, ne serait donc pas considérée par lui comme une fermentation proprement dite. Que *Pasteur* ne prenne d'ailleurs pas sa définition au pied de la lettre, cela res-

sort de ce qu'il fait remarquer lui-même que la propriété fermentative de la levure subsiste également sous l'influence de l'air, quoiqu'à plus faible degré qu'à l'abri de l'oxygène. La justesse de cette assertion dans de certaines conditions, fut en particulier constatée pour la levure basse, par *Pedersen* (1878) et *Hansen* (1879), qui trouvèrent que la quantité de substance sèche dans du moût de bière transformée en alcool, en acide carbonique, etc., par une quantité déterminée de levure, était moins forte lorsque le moût était aéré pendant la fermentation, que lorsqu'il ne l'était pas. Un résultat analogue fut obtenu par *Ed. Buchner* (1883), à la suite de recherches qu'il fit dans ce sens-là avec des bactéries.

Dans ses recherches, *Hansen* fit en sorte que les cellules renfermées dans le récipient que l'on aërait, tourbillonnassent sans cesse pour être complètement entourées de l'air, qui avait largement accès. Comme elles provoquèrent néanmoins une fermentation alcoolique prononcée, on put donc en conclure avec certitude que celle-ci n'était pas la conséquence nécessaire de la vie sans air.

Dans sa « Théorie de la fermentation » (1879), *Naegeli* démontra que la présence de l'oxygène était même très favorable à la fermentation alcoolique d'une solution sucrée, quand il n'y a pas d'autres substances nutritives à côté du sucre, et que par conséquent la quantité de levure n'augmente pas, ou seulement d'une manière insignifiante. Aussi *Naegeli* dit (page 26) : « La théorie de *Pasteur*, suivant laquelle la fermentation se produirait par suite du manque d'oxygène, ce qui forcerait les cellules de levure à emprunter la quantité nécessaire d'oxygène à la substance en fermentation, se trouve réfutée par tous les faits se rapportant à cette question ».

Cette manière de voir est également partagée par

A.-J. Brown. Celui-ci exécuta une série d'expériences où la fermentation s'effectuait en présence de grandes quantités d'oxygène, tandis que dans des essais parallèles, ce gaz se trouvait complètement exclu. Dans les deux séries d'expériences, il employa des quantités identiques de cellules de levure, qui se trouvaient dans des conditions telles qu'il leur était impossible de se multiplier. Toutes les autres conditions étaient égales dans les deux séries. Il en résulta — en opposition à la théorie de *Pasteur* — que dans le premier cas, les cellules offrirent une plus grande activité fermentative, que lorsque l'oxygène était exclu.

Brown fait ressortir que la théorie de *Pasteur* repose sur les essais de fermentation comparatifs, desquels il conclut que le *pouvoir ferment* de la levure — c'est-à-dire la relation pondérale entre la levure formée et le sucre fermenté — était très grand à l'abri de l'air, mais très faible au contact de l'air. Contre ces essais, *Brown* soulève des objections très fondées. Dans sa détermination du pouvoir ferment, *Pasteur* ne s'occupe pas de la durée de la fermentation (*Etudes sur la bière*, page 243), car il rapproche des fermentations n'ayant duré que quelques heures, d'autres d'une durée de plusieurs mois, sans tenir compte, dans son calcul, de cette différence de temps des fermentations. *Pasteur* dit que la levure a une très grande activité quand elle trouve l'oxygène à sa disposition, et qu'elle peut décomposer, dans ce cas, beaucoup de sucre en peu de temps; l'énergie ou l'activité est donc exprimée par la quantité de sucre fermenté dans l'unité de temps et par le rapport entre le poids de sucre décomposé d'une part, et le poids de levure et le temps écoulé d'autre part. En désignant le sucre fermenté par S , la quantité de levure formée par L , et la durée de la fermentation par T , suivant *Pasteur* le pouvoir ferment est $\frac{S}{L}$ et l'énergie $\frac{S}{LT}$. Mais le travail de la cellule de levure est continu et l'ex-

pression $\frac{S}{L}$ représente par conséquent la quantité de sucre décomposé par une quantité de levure pendant toutes les unités de temps que la fermentation a duré. Dans des expériences comparatives faites dans le but de déterminer le *pouvoir ferment* de la levure, il faut donc nécessairement tenir compte du temps, car le temps influe sur le résultat des expériences, d'après lesquelles *Pasteur* détermine le *pouvoir ferment* et sur lesquelles repose sa théorie ; mais comme il ne tient pas compte du temps dans son calcul, les déterminations ne peuvent être exactes, et les principes de sa théorie sont détruits. Le « *pouvoir ferment* » et « *l'énergie* » de la levure de *Pasteur* sont donc deux choses absolument identiques.

Dans les expériences de *Pasteur*, les déterminations du temps, nécessaires pour établir le *pouvoir ferment* total, ne purent être faites ; car la quantité de sucre sur laquelle la levure devait exercer son *pouvoir*, était trop minime. Lorsque *Brown* entreprenait une fermentation conformément aux expériences de *Pasteur* en présence de l'air, et qu'après fermentation du sucre initial il ajoutait de nouvelles quantités de sucre, la levure pouvait décomposer le triple de la quantité de sucre présente au début de l'expérience, sans qu'il y eût augmentation du poids de levure. Il faut aussi ajouter que *Pasteur* employait du sucre de canne, qui devait d'abord être interverti ; cette *interversion*, qui est indépendante de la fonction du *ferment*, devait être très lente dans les conditions dans lesquelles les expériences de *Pasteur* étaient faites, et il aurait dû tenir compte du temps qui y avait été nécessaire.

Brown fait encore remarquer qu'aucun des résultats de *Pasteur* ne contredit l'interprétation opposée de la nature de la fermentation, à savoir que la cellule de levure exerce sa fonction indépendamment de son entourage, ainsi par exemple, qu'il y ait ou non de l'oxygène libre en présence.

Hueppe et ses élèves ont également dirigé leurs attaques contre la théorie de la fermentation de *Pasteur*, et ils ont fourni des exemples d'organismes-ferments « qui, en présence de l'oxygène de l'air, activent les fermentations spécifiques, et cela le plus souvent même mieux ».

Parmi les nombreux travaux de *Naegeli* sur les organismes inférieurs, nous nous bornerons à citer, comme se rattachant à ce qui précède, la théorie « moléculaire-physique » de la fermentation qu'il établit, et qui est en réalité une modification de celle de *Liebig*. Tandis que *Pasteur* explique la fermentation comme étant le résultat d'une activité se développant à l'intérieur de la cellule, *Naegeli* la définit comme une transmission des états vibratoires des molécules, des groupes d'atomes et des atomes de différentes combinaisons qui constituent le plasma vivant (combinaisons qui n'éprouvent elles-mêmes aucun changement) sur la substance fermentescible, ce qui a pour effet de détruire l'équilibre dans ses molécules et de les décomposer. Dans la fermentation, les vibrations des molécules du plasma sont transmises de cette manière à la substance fermentescible. La cause de la fermentation se trouve dans le plasma vivant, c'est-à-dire à l'intérieur de la cellule, mais son action s'étend au-delà de celle-ci. *La décomposition du sucre* — principalement en alcool et en acide carbonique — s'opère moins à l'intérieur, mais en plus grande partie à l'extérieur des cellules de levure. Ainsi cette théorie est contraire à celle de *Pasteur* et se rattache à celles de *Stahl* et de *Liebig*.

Ivanowsky prétend, basé sur ses expériences faites avec des cultures absolument pures, que l'introduction d'oxygène pendant la fermentation, n'exerce aucune influence sur l'activité fermentative de la levure. Il constata qu'une quantité donnée de levure peut faire fermenter autant de sucre dans un liquide fortement aéré que dans

l'azote pur. D'après cet auteur, la fermentation alcoolique effectuée par la cellule de levure, dépend uniquement de la *composition* du milieu nourricier. Il considère cette fonction comme le résultat d'un état pathologique, se manifestant pendant la nutrition de la levure, et qui serait provoqué par une composition anormale du liquide nourricier. Le liquide nourricier normal contient peu de sucre et environ le double de peptone, la levure s'y développe énergiquement et se nourrit comme d'autres champignons, sans donner lieu à une *fermentation alcoolique proprement dite*. Il fait par contre ressortir que ce qu'on appelle la « *respiration intra-moléculaire* » de la levure et d'autres plantes, où il se forme outre d'autres substances aussi de l'alcool, est due à l'absence d'oxygène, et que cette fonction respiratoire se manifeste distinctement lorsqu'on développe la levure dans un liquide peu sucré.

Giltay et *Aberson* confirment au contraire les résultats de *Pedersen* et *Hansen* indiqués plus haut, que dans les cultures non aérées, l'unité de levure produit plus d'alcool que dans celles qui furent aérées; ils admettent que le plus fort développement de levure constaté au contact de l'air peut dépendre essentiellement du mouvement imprimé au liquide de culture par le passage du courant d'air et de la meilleure nutrition de la cellule de levure qui en est la conséquence.

Les célèbres travaux d'*Émile Fischer*, d'ordre purement chimique, sur la *synthèse des sucres*, l'emploi de la phénylhydrazine et de la réaction osazonique, ont dirigé les notions sur les phénomènes fermentaires dans de nouvelles voies. Ses recherches l'ont amené à expliquer le rapport de la cellule de levure aux sucres du liquide nourricier, de la même manière que l'activité des enzymes (invertine, émulsine), de sorte que l'action chimique de la cellule vivante ne diffère pas de celle des ferments chimiques. Suivant *Fischer*, la *fermentation des polysac-*

charides serait toujours précédée d'une hydrolyse du sucre. Mais il existe une relation exacte entre la structure moléculaire d'un sucre et l'enzyme de la cellule de levure qui transforme le sucre. Quand un sucre arrive en contact avec les matières albuminoïdes d'une cellule de levure, qui jouent le plus grand rôle parmi les agents utiles à la cellule vivante, le sucre n'est décomposé que lorsque la configuration, la construction géométrique de ses molécules, n'est pas trop éloignée de la configuration de la substance albuminoïde. D'après la théorie de *Fischer*, la fonction de la cellule vivante dépend bien plus de la géométrie moléculaire que de la composition de la matière nutritive.

L'analyse des espèces de levure de *Hansen* et d'autres levures, comparée aux sucres artificiels que *Fischer* prépara synthétiquement, amena cet auteur, ainsi que *Thierfelder*, à la constatation de la théorie de la fermentation énoncée plus haut, car ces chercheurs trouvèrent aussi ici, que les levures sont très sensibles à la configuration géométrique de la molécule du sucre, tandis qu'elles sont insensibles à d'autres variations dans la constitution moléculaire.

Parmi les différents sucres obtenus par synthèse que *Fischer* examina à l'égard des levures, il faut citer la *mélibiase*, qui est fermentée par les levures de bière ordinaires à fermentation basse, mais non pas par la plupart des levures de brasserie à fermentation haute. Aussi *Fischer* constata dans la levure basse la présence d'un enzyme pouvant être extrait en lessivant de la levure séchée, et qui dédouble la mélibiase en glucose et en galactose; mais après un certain traitement des levures hautes employées, on ne peut plus observer le dédoublement de cette espèce de sucre. Comme la levure haute renferme de l'invertine, le ferment dédoublant la mélibiase doit différer de l'invertine.

C. J. Lintner et Fischer prouvèrent par les procédés introduits par ce dernier, que la *maltose* naturelle, exposée à l'action d'un extrait aqueux de levure séchée, est dédoublée en glucose, et qu'il existe une différence évidente entre l'enzyme qui est en jeu et l'invertine dédoublant le sucre de canne. Fischer donne au premier le nom de glucase de levure ou maltase de levure. Sa température optimale se trouve à environ 40°, tandis que celle de l'invertine est située, d'après Kjeldahl, entre 52 et 53°.

Prior a comparé l'énergie fermentative de diverses espèces de levure, en les examinant exactement, dans des conditions identiques, d'après le procédé de Meissl. Il constata des différences considérables, dont les chiffres suivants (calculés d'après la substance de levure sèche) nous donnent quelques exemples :

La levure de Carlsberg	I	montra	136,40
— —	II	—	106,13
Saccharomyces Pastorianus	I	—	153,48
— —	II	—	280,72
— —	III	—	202,20
— ellipsoideus	I	—	285,76
— —	II	—	219,03

L'auteur cité croit pouvoir expliquer en partie cette diversité d'action des espèces de levure par l'hypothèse que chez les différentes espèces la *paroi cellulaire* n'a pas la même épaisseur et possède une *perméabilité variant suivant l'espèce*; il suppose que l'épaisseur de la couche mucilagineuse extérieure de la paroi joue ici un rôle. En outre, il conclut, d'après des essais comparatifs effectués avec la même race de levure vis-à-vis de diverses espèces de sucre, que la *diffusibilité des différents sucres à travers la membrane cellulaire varie selon l'espèce*. Le sucre de canne montra la plus forte, la maltose la plus faible diffusibilité.

Citons enfin encore, dans ce court aperçu, les notes préliminaires que nous a données récemment *Ed. Buchner* sur la *séparation de l'action fermentative de la cellule de levure vivante*. On mélangea de la levure de brasserie ordinaire avec du sable quartzéux et de la terre d'infusoires, puis cette masse fut broyée, additionnée d'eau et soumise à une pression de 4 à 500 atmosphères. Le liquide ainsi obtenu, qui contient des substances provenant de l'intérieur des cellules de levure, est capable de mettre rapidement en fermentation des solutions très concentrées de divers sucres, même après filtration à travers des bougies en terre d'infusoires ou après saturation du mélange de ce liquide et de la solution sucrée avec du chloroforme. *Buchner* conclut de ses essais que le promoteur de cette action fermentative du suc de levure est à considérer comme une substance probablement albuminoïde, de la nature d'un enzyme, dissoute et isolée du plasma cellulaire vivant, à laquelle il donne le nom de *zymase*. Lorsqu'on conserve ce suc, il devient bientôt inactif; mais mélangé à une solution de saccharose à 75⁰/₀, il garde son pouvoir ferment pendant un certain temps. En faisant évaporer, puis sécher ce suc, on obtient une masse friable, jaunâtre, capable de manifester pendant un temps assez long son activité fermentative. Les recherches de *Buchner* se rattachent donc aux théories chimiques de *Traube* et de *Fischer* mentionnées plus haut.

Rayman et *Kruis* contribuèrent à la biologie des levures par leurs études sur des bières dont la fermentation avait été effectuée pendant plusieurs années avec des cultures absolument pures, préparées d'après la méthode de *Hansen*. Ils constatèrent, comme produit de la fermentation, des cultures pures de *Saccharomyces* obtenus à la température usitée dans les brasseries et dans des conditions pratiques normales, un seul alcool, savoir

l'alcool éthylique. Cet alcool reste pendant des années dans la bière, à côté de la levure vivante, quand on conserve le liquide à basse température à l'abri de l'air. Si, par contre, il se développe au contact de l'air un voile de l'espèce de levure employée, il se produit une oxydation active dans laquelle *l'alcool est décomposé en acide carbonique et en eau*. Des recherches ultérieures des mêmes auteurs ont démontré que les levures de distillerie cultivées peuvent, dans de certaines conditions, probablement lorsque les cellules se trouvent dans un état d'épuisement, former de l'alcool *amylique* (huile de pommes de terre), de l'*acétaldéhyde* ainsi que du *furfurol* ; on suppose que l'acétaldéhyde est un produit d'oxydation de l'alcool éthylique, se développant au fur et à mesure de sa formation. Dans des fermentations de longue durée, les matières albuminoïdes du liquide nourricier sont hydratées à différents degrés par les *Saccharomyces*, qui peuvent également oxyder les produits de l'albumine en acide formique et en acide valérianique. Les auteurs distinguent deux actes dans les fermentations normales, à savoir un acte de décomposition sur le sucre dans le milieu nourricier et un acte de synthèse de l'azote dans le corps des organismes. La fermentation est considérée comme des hydratations et des déshydrations alternatives.

Dans toute la série des différentes théories de la fermentation, le point essentiel de toutes les questions qui s'y rattachent, ne se trouve pas du tout touché : d'où vient-il que dans les cellules microscopiques le *plasma*, qui a le même aspect dans les différentes espèces, provoque néanmoins dans une cellule une fermentation acétique, dans une autre une fermentation butyrique ; qu'il soit capable, dans telle cellule, de faire fermenter directement le sucre de canne, tandis que dans telle autre il ne le peut qu'après une transformation préalable ? La

cause de ces activités différentes du plasma est encore un problème à résoudre.

Remarques générales sur les recherches de Hansen.

Comme il ressort de l'exposé précédent, nos connaissances des ferments alcooliques étaient bien défectueuses et vagues lorsque *Hansen* entreprit ses recherches. Le problème dut donc être étudié à fond par voie expérimentale. C'est ce que *Hansen* fit dans des travaux soutenus sans relâche pendant nombre d'années.

Les devanciers de *Hansen* étaient arrivés par les chemins qu'ils suivirent aussi loin qu'il leur était possible d'arriver. Si nous comparons leurs recherches, et en particulier celles de *Pasteur* et de *Reess*, à celle de *Hansen*, nous trouvons que ce dernier savant partit de points de vue nouveaux et de méthodes nouvelles. Il étendit ses investigations dans toutes les directions de ce domaine, tant en profondeur qu'en étendue. Ses recherches ont pour cela, non seulement frayé le chemin au point de vue scientifique, mais elles ont encore opéré une réforme dans l'industrie de la fermentation. C'est pourquoi elles formeront avec raison l'objet principal de ce chapitre de notre livre.

Lorsque *Hansen* publia, en 1878, son mémoire sur les organismes dans la bière et dans le moût de bière, il fit ressortir l'incertitude qui régnait dans les travaux sur les *Saccharomyces* proprement dits; il déclara qu'il n'était pas possible d'avancer dans le chemin poursuivi par ses devanciers, et qu'au contraire, si les recherches devaient faire avancer ce que *Pasteur* et *Reess* avaient commencé, il fallait qu'elles partissent de points de vue tout à fait

différents. Ce n'est que vers la fin de l'année 1881, qu'il réussit à trouver la clef du problème. La tâche qui se présentait en premier lieu était de développer une méthode permettant d'obtenir des végétations qui provinssent chacune d'une seule cellule, pour démontrer ensuite par l'expérience, si les cultures pures ainsi obtenues possédaient des caractères constants — c'est-à-dire si les *Saccharomyces* se présentaient comme espèce, comme variété, ou comme race — et dans le cas affirmatif, de déterminer en quoi consistaient ces caractères constants. Ce problème une fois résolu, il s'agissait de trouver une méthode pour l'analyse de la levure et d'étudier de différents côtés les conditions vitales de ces organismes.

Préparation de la culture pure.

Nous avons déjà fait voir dans le premier chapitre de ce livre que de différents côtés on exprima l'idée que la condition nécessaire pour arriver à connaître les organismes microscopiques, dont nous trouvons des centaines et des milliers dans chaque gouttelette examinée au microscope, consistait uniquement à isoler la cellule individuelle et à travailler avec une végétation pure provenant de celle-ci. Nous avons en même temps indiqué brièvement les différentes méthodes que l'on avait suivies.

Hansen a démontré à plusieurs reprises dans ses écrits, que dans tous les cas la seule méthode certaine est de prendre l'individu comme point de départ et d'en suivre le développement dès l'origine. Il a, dans ce but, élaboré deux méthodes différentes. La première était basée sur des cultures dans des liquides ; la seconde sur des cul-

tures dans des milieux solides, dans les deux cas, après une dilution préalable, comme cela a été décrit pages 27-42.

A l'aide des connaissances acquises des espèces, il fut possible de soumettre ces méthodes à une vérification détaillée, d'où il résulta qu'elles étaient exactes.

S'il s'agit d'isoler d'une végétation formée d'un mélange de différentes espèces, celles qui se trouvent à l'état *affaibli*, il est alors nécessaire, comme *Hansen* le fait remarquer, d'employer pour la dilution et l'ensemencement un liquide nutritif favorable, par exemple du moût de malt ou de raisin qui présente à l'organisme en question les conditions de nutrition les plus favorables. L'ensemencement se fait soit dans des ballons, soit par gouttes que l'on introduit, chacune séparément, dans une chambre humide.

Si par contre, l'autre cas se présente, où l'on désire éliminer d'une végétation mélangée l'espèce qui s'y trouve dans un état de développement très vigoureux, et dont la croissance ne dépend par conséquent pas de conditions de nutrition particulièrement favorables, on peut atteindre le but plus rapidement et avec moins de frais par l'emploi d'un milieu nourricier solide, qui sera dans ce cas de la gélatine et du moût.

Il est prouvé qu'une addition de gélatine à du moût diminuait la valeur de ce dernier comme matière nutritive pour les levures. Ainsi, *Holm* démontra par des séries d'expériences précises, que lorsqu'on introduit des cellules dans du moût gélatinisé, dès le commencement de la fermentation, quand elles sont le plus vigoureuses, environ quatre pour cent des cellules ensemencées ne donneront pas de développement; si on ensemence par contre la végétation à la fin de la fermentation, quand les cellules sont affaiblies, il y en aura environ vingt-cinq pour cent qui ne donneront pas de colonies.

Ces méthodes telles que *Hansen* les a élaborées pour

l'étude des champignons bourgeonnants, présentent donc l'avantage de pouvoir *observer directement au microscope l'individu, et de suivre son développement ultérieur*, puis-que la plaque de gélatine ou la goutte se trouvent renfermées dans la chambre humide. (Voir l'exposé précédent des questions se rattachant à ce sujet, au chapitre I).

L'Analyse.

Toute la série des travaux de *Hansen* est dominée par une idée fondamentale, à savoir que *la forme, la dimension et l'aspect de la cellule ne suffisent pas par elles-mêmes pour établir les caractères d'une espèce*, attendu qu'en raison de différentes conditions extérieures, cette même espèce peut se présenter d'une manière toute différente et avec un caractère entièrement différent. Par contre, les formes de développement de la cellule envisagées à un autre point de vue, peuvent fournir des caractères très importants pour séparer les espèces. Ainsi on trouve, *que les différentes espèces soumises au même traitement se comportent très différemment, soit au point de vue général, soit en particulier à celui de la forme*. Ceci ne peut s'expliquer que par la mise en jeu de propriétés intrinsèques, inhérentes aux cellules individuelles.

Nous donnons ici un aperçu des différentes voies par lesquelles *Hansen* découvrit les caractères des différentes espèces. Ces recherches contribuent en même temps à la connaissance de la physiologie générale des levures.

a. — *Image microscopique de la levure déposée.*

Le premier examen d'une espèce quelconque de levure consistera ordinairement à observer au microscope la levure de dépôt. Pour donner un exemple de ce que l'on peut obtenir par ce moyen, nous renvoyons aux figures suivantes (47, 50, 54, 56, 58.), qui représentent les jeunes formes de levure déposée des six espèces de *Saccharomyces* décrites en particulier par Hansen. Ces végétations furent obtenues en transportant les cellules qui avaient été cultivées pendant quelque temps dans du moût, dans un nouveau moût, où elles arrivèrent à un développement vigoureux au bout de 24 heures à 25-27° C. Si l'on compare par exemple les figures de *Saccharomyces cerevisiæ* aux trois espèces de *pastorianus*, l'ensemble de l'image nous montrera une différence considérable: le *Saccharomyces cerevisiæ I* est formé principalement de grandes cellules rondes ou ovales, les espèces de *pastorianus* ont pour la plupart des cellules allongées, en forme de boudin. Mais la chose se présente tout autrement quand on mélange des cellules de la première espèce à des cellules d'une des autres espèces mentionnées. Il n'est alors pas possible, si l'on ne se base que sur l'observation des formes, de distinguer les grandes et les petites cellules ovales ou rondes de l'espèce *pastorianus*, de beaucoup de cellules du *Saccharomyces cerevisiæ I*. Les deux espèces *Saccharomyces ellipsoideus I et II* sont formées essentiellement de cellules ovales et rondes; il se présente cependant aussi des cellules allongées, de sorte qu'il n'est non plus possible dans ce cas, d'obtenir une distinction des espèces par l'observation des formes, quand elles se trouvent mêlées au *Saccharomyces cerevisiæ I* ou au *Saccharomyces pastorianus*.

Des mesures directes exécutées sur ces formes de levure de dépôt ne nous fourniront non plus de points d'appui.

Un examen de ces six groupes de figures de cultures pures montre qu'on est en présence de *trois différentes classes de levure* ; dont l'une est représentée par le *Saccharomyces cerevisiae I*, tandis que la seconde comprend les trois espèces *pastorianus*, la troisième les deux espèces *ellipsoïdeus*. Voilà *absolument tout* ce que l'examen purement microscopique nous permet de reconnaître, et il faut encore remarquer que cela ne se peut que dans les conditions de culture indiquées.

b. — *La formation des ascospores.*

Les recherches de *Hansen* sur la formation de spores endogènes qui a lieu à l'intérieur des cellules des *Saccharomyces*, ont été le premier fondement d'une *méthode analytique* pour les levures. Nous donnons ici un aperçu de la méthode expérimentale et des résultats obtenus en général.

La sporulation dans les cellules de levure a été étudiée par plusieurs savants (pages 166-168) De toutes ces recherches en partie contradictoires, il ne résulta que ceci de certain : c'est que *la cellule des Saccharomyces pouvait, dans de certaines conditions restées inconnues, former des spores à son intérieur.*

À la suite de nombreuses expériences, *Hansen* réussit à établir les *lois suivantes pour la sporulation des Saccharomyces* :

1° *L'air atmosphérique doit avoir abondamment accès aux cellules, qui doivent être semées sur une surface humide ;*

2° Il n'y a que les cellules jeunes et vigoureuses qui peuvent remplir les fonctions de la sporulation.

3° La température la plus propice se trouve pour la plupart des espèces examinées jusqu'à présent aux environs de 25° C. Cette température est favorable à la sporulation des espèces connues jusqu'à présent.

4° Quelques *Saccharomyces* forment des spores même lorsqu'ils se trouvent dans des solutions nourricières en fermentation.

La levure se développe comme cela est indiqué page 187. De vieilles cultures qui avaient été développées dans des solutions de saccharose ou dans du moût, doivent être cultivées plusieurs fois, souvent même pendant assez longtemps, dans du moût aéré, avant de pouvoir montrer une sporulation normale. On en porte de petites quantités sur de petits blocs de plâtre préalablement stérilisés. Ces petits blocs ont la forme d'un cône tronqué et sont placés dans de petites cuvettes plates en verre avec couvercle, et on les maintient humides en remplissant les cuvettes à moitié d'eau (1). Si l'on a seulement pour but de provoquer en général la formation mentionnée, on peut laisser les appareils à la température ordinaire des chambres.

Une description exacte de la *structure des spores* et un exposé détaillé de leur *développement*, fondé sur des *observations sur l'individu*, a, pour la première fois été

(1) On peut aussi produire les ascospores en portant la levure sur de la gélatine stérilisée et solidifiée avec ou sans liquide nourricier dans un endroit humide; de même dans de l'eau de levure ou de l'eau stérilisée. Enfin dans les formations de voiles des *Saccharomyces* il peut aussi se présenter des cellules développant des spores. — Il va sans dire que la méthode n'est pas donnée par les différents milieux nourriciers, mais uniquement par la connaissance des éléments qui, en général, permettent aux cellules l'accomplissement de cette fonction.

donné par Hansen. Sous ce rapport, il indique *trois groupes de Saccharomyces avec des caractères typiques distincts*,

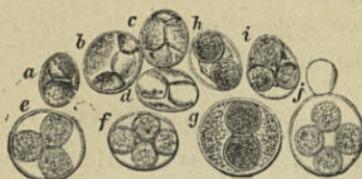


FIG. 37.

Les premières phases de développement des spores du *Sacch. cerevisiæ I* d'après Hansen. *a, b, c, d, e* rudiments des spores, la paroi n'est pas encore distincte; *f, g, h, i, j* spores complètement développées avec parois distinctes.

qui sont les *rudiments des spores* (Fig. 37). Après cette première phase de développement, elles s'entourent d'une

paroi qui, chez les différentes espèces, apparaît plus ou moins distinctement.

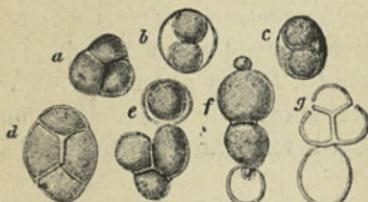


FIG. 38.

Spores du *Saccharomyces cerevisiæ I* commençant à germer, d'après Hansen. *a, d, e* et *g* montre la formation des cloisons. Dans *e, f* et *g*, les parois de la cellule-mère sont rompues. *g* nous montre un corps de spores divisé en plusieurs loges, dont la paroi est rompue en trois endroits.

exercer l'une sur l'autre pendant qu'elles se trouvent encore dans la cellule-mère, ce que l'on appelle des cloisons (Fig. 38). Ceci fait qu'une quantité plus ou moins considérable de plasma reste serrée en forme de coins ou

qui diffèrent les uns des autres dans le mode de germination ou dans la forme des spores.

Au bout d'un certain temps, variant avec les espèces, il se forme à l'intérieur de la cellule des corpuscules de plasma arrondis,

Dans le premier type qui comprend le *Saccharomyces cerevisiæ I*, les spores peuvent, dès les premières phases de la germination, se gonfler si fortement qu'il en résulte, par la pression qu'elles

de plaques entre les spores, ou bien que les parois des spores entrent elles-mêmes en contact intime les unes avec les autres. Pendant le développement ultérieur, il peut se produire une fusion complète entre les parois, ce qui constitue une véritable formation de cloisons; la cellule

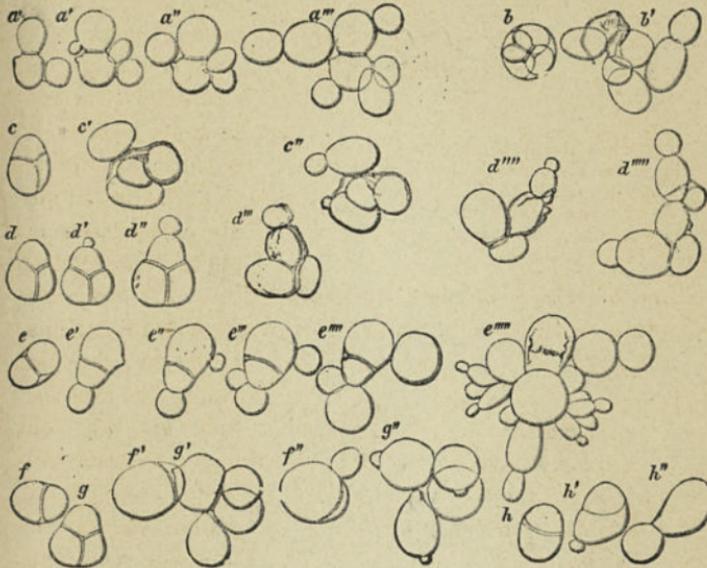


FIG. 39.

Bourgeoisement des spores chez le *Saccharomyces cerevisiae* I d'après Hansen. **a** Trois spores sans la paroi de la cellule-mère; **b** cellule avec quatre spores, dans **b'** la paroi de la cellule-mère est rompue; **c** cellule avec quatre spores, dont trois sont visibles, dans **c'** et **c''** on voit la paroi rompue de la cellule-mère; **d** cellule avec trois spores, dans **d'''** la paroi rompue de la cellule-mère; **e-e''''** développement d'une très forte colonie; **f-h** autres formes de développement, dans **h''** la paroi entre les deux spores a disparu.

est alors devenue un corps de spores à plusieurs loges.

Pendant la germination (Fig. 39) les spores se gonflent, et la paroi de la cellule-mère, qui était primitivement passablement épaisse et élastique, s'étend, de sorte qu'elle devient plus mince et plus fine. Finalement elle se rompt

et reste à l'état de voile plissé ou froncé qui enveloppe les spores en partie, — ou bien elle est peu à peu absorbée pendant la germination.

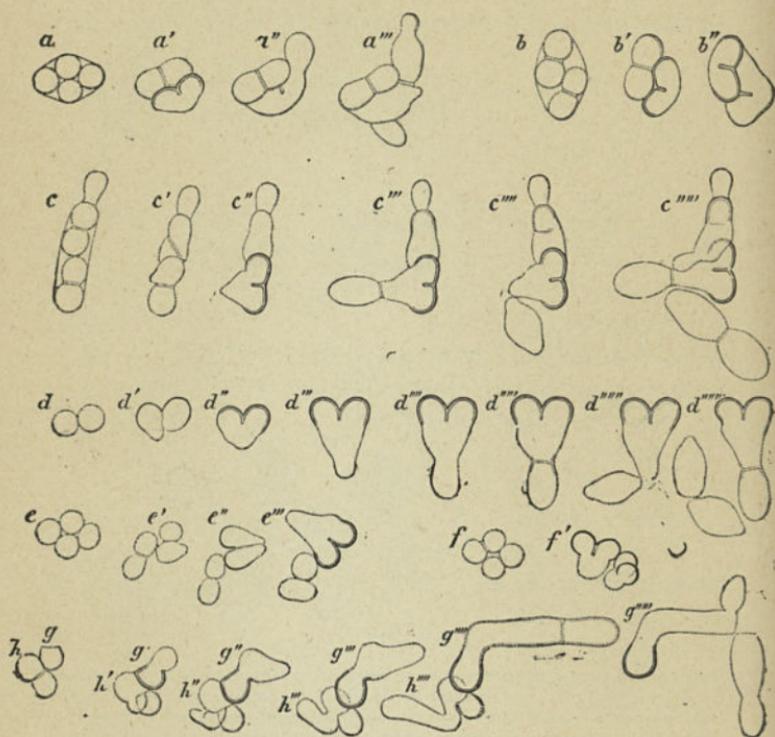


FIG. 40

Bourgeoisement des spores chez le *Saccharomyces Ludwigii*, d'après Hansen. a-c proviennent d'une culture sur blocs de plâtre âgée de 12 jours, d-h d'une même culture datant de 1 1/2 mois.

En chaque point de la surface de la spore gonflée il peut pousser un bourgeon. Ce bourgeoisement a lieu ordinairement après la rupture ou l'absorption de la cellule-mère, il peut cependant exceptionnellement se produire à

l'intérieur même de la cellule-mère. Après la formation des bourgeons, les spores peuvent rester unies, ou bien se séparer rapidement.

Il y a des spores qui manifestent un caractère particulièrement remarquable (voir Fig. 39 *e-e'''* et *hh''*). Ici la paroi séparant deux spores contiguës est dissoute, de sorte que celles-ci se fondent en une seule spore. Hansen croit que l'importance biologique de ce phénomène consiste dans le fait que les spores sont par là mieux à même

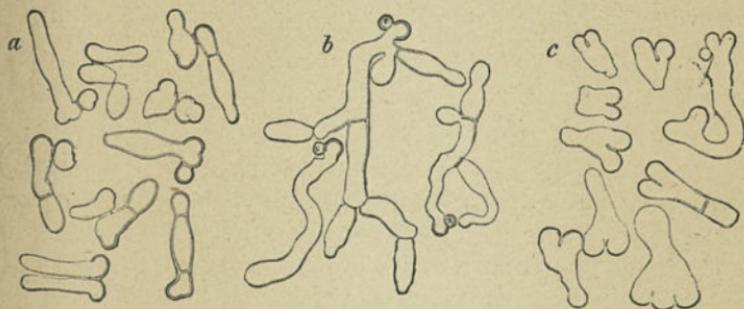


FIG. 41

Saccharomyces Ludwigii, d'après Hansen.

Spores en germination provenant de vieilles cultures sur blocs de plâtre. **a** et **b** nous montrent des groupes de spores dont chacune développe son tube germinatif particulier ; dans **c** on voit différentes formes de fusion.

de bourgeonner dans des circonstances difficiles, que lorsqu'elles sont séparées. Une spore joue donc, dans ce cas, vis-à-vis de l'autre, le rôle d'un parasite. Nous avons peut-être un commencement de cette fusion dans le corps de spores à plusieurs loges mentionné plus haut.

Dans les espèces des groupes *Saccharomyces pastorianus* et *Saccharomyces ellipsoïdeus* que Hansen a examinées à ce point de vue, la germination se fait essentielle-

ment de la même manière que pour le *Saccharomyces cerevisiae* I.

Un second type tout différent se présente avec le *Saccharomyces Ludwigii* (Fig 40) où la fusion se produit dès les toutes premières phases de la germination. Ce sont ici les formations nouvelles et non les spores qui s'unissent. Ces formations nouvelles se distinguent encore du type précédent en ce qu'elles ne sont pas des cellules de levure, mais des formations mycéliennes, un *promycelium*. De ce *promycelium* part le développement des cellules de levure, qui sont délimitées par une paroi transversale bien

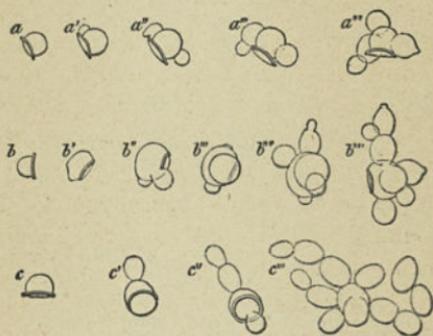


FIG. 42

Germination des spores du *Saccharomyces anomalus*, d'après *ansen*.

marquée, après quoi ces cellules se séparent et ne s'arondissent que plus tard. Ces cellules de levure produisent à leurs extrémités des bourgeons qui sont également délimités par des parois transversales.

Les vieilles spores ne présentent ces fusions particulières que plus rarement (Fig 41). Quelques tubes germinatifs (groupe *b*) se développent pour former un *mycélium* ramifié.

Le troisième type, que représente le *Saccharomyces anomalus* (Fig. 42, voir aussi cette espèce), se distingue

surtout des précédents par ce qu'il possède des spores d'une *forme toute différente* de celle des autres espèces, et qui ressemblent aux spores de l'*Endomyces decipiens* (1). Elles forment à peu près un hémisphère avec un filet saillant partant de la base.

Pendant la germination de la spore, celle-ci se gonfle et le filet saillant peut rester ou disparaître. Il pousse alors de différents points de la surface de la spore des bourgeons qui s'en séparent.

Dans les expériences de *Hansen*, il s'agissait aussi de déterminer quelle influence les différentes *températures* exerçaient sur la sporulation, pour savoir si les espèces se comportaient de la même façon, ou s'il était possible de découvrir ainsi des caractères différents. Il fallut déterminer : 1° *Les températures limites*, c'est-à-dire la plus haute et la plus basse température permettant encore le développement des spores ; 2° *la température optima*, c'est-à-dire celle où les spores apparaissent le plus rapidement ; et enfin, 3° *l'état des températures se trouvant entre les limites extrêmes*.

Pour déterminer le temps nécessaire aux cellules pour procréer des spores, on choisit le moment où *les cellules présentent les signes distincts de spores naissantes* (Voir Fig. 37 et 43). Il n'est pas possible de se servir, pour cette observation, de la spore mûre, car il n'existe pas de critérium de la maturité complète.

Les résultats obtenus par *Hansen* sont les suivants :

La sporulation se produit lentement à basse température, mais plus rapidement à mesure que la température s'élève jusqu'à un certain point ; dès qu'on dépasse ce point optimum, le développement devient de plus en plus lent jusqu'à ce que finalement il cesse complètement.

(1) Un champignon qui vit en parasite sur les lamelles de certains agarics.

Les limites les plus basses de la température de la

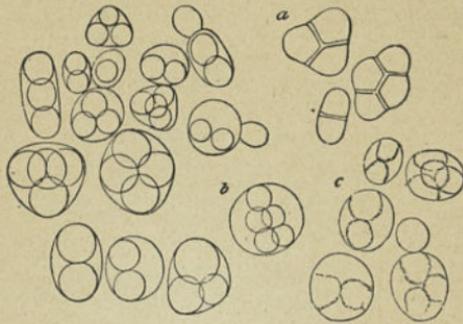


FIG. 43¹

Saccharomyces avec ascospores, d'après Hansen

1. *Saccharomyces cerevisiae* I, 2. *Saccharomyces pastorianus* I.
3. *Sacch. pastorianus* II, 4. *Sacch. pastorianus* III, 5. *Sacch. ellipsoideus* I,
6. *Sacch. ellipsoideus* II, a Cellules avec formations de cloisons, b Cellules avec une quantité de spores supérieure à la normale, c cellules avec spores naissantes très distinctes.

sporulation furent trouvées, pour les six espèces décrites

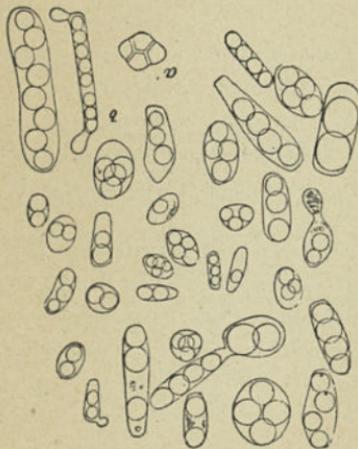


FIG. 43₂

en premier lieu, entre 0,5 et 3°C., celles de la température la plus élevée à 37 1/2° C. On trouva pour ces six espèces, pour lesquelles Hansen détermina également la relation de la température au temps entre ces deux limites extrêmes, que lorsque ces deux quantités étaient représentées graphiquement, de manière à prendre les degrés de tempé-

rature comme abscisses et les temps comme ordonnées,

il en résultait des courbes qui avaient essentiellement les mêmes formes pour toutes les six espèces. Ces courbes s'abaissent à partir de l'ordonnée du degré de tempé-

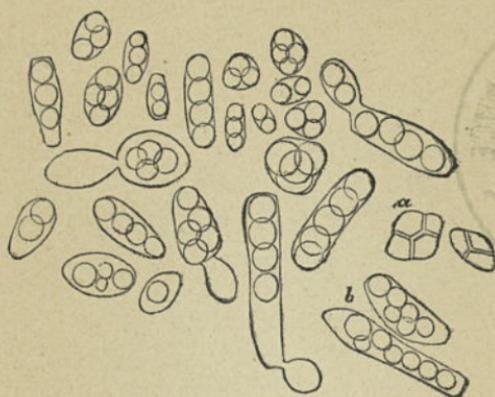


FIG. 43 3

rature le plus bas vers l'axe des abscisses dont elles s'éloignent ensuite de nouveau. En même temps, il résulte de ces courbes, que ce sont principalement les points cardinaux déterminés par la température la plus élevée et la plus basse qui nous donnent les caractères distinctifs des espèces, c'est-à-dire que les limites de la température entre lesquelles la sporulation peut avoir lieu pour les différentes espèces, sont différentes (Voir la description des six espèces).

En ce qui concerne le temps nécessaire à la formation des spores dans les six espèces examinées aux mêmes conditions de température, on remarquera ce qui suit : à la température maximum, le développement demande, chez

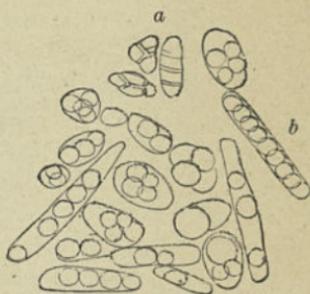
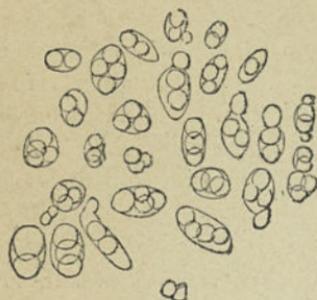


FIG. 43 4

toutes les espèces, environ trente heures avant de se produire ; à 25° C., on ne trouve également pas de très grandes différences de temps ; mais à des températures inférieures, les différences sont frappantes. Ainsi, par exemple, le *Saccharomyces cerevisiæ* I ne développe ses

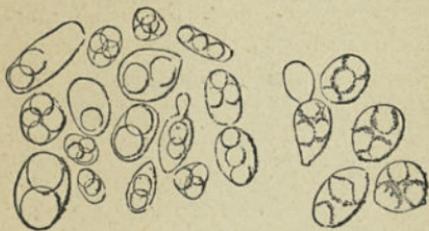
spores à 11 1/2° C., qu'au bout de 10 jours : le *Saccharomyces pastorianus* II au bout de 77 heures, etc.

Dans toutes les déterminations de ce genre, l'état des cellules a une très grande importance suivant que celles-ci se sont développées à haute ou à basse température, sui-

Fig. 43^b

vant qu'elles étaient vieilles ou jeunes, faibles ou vigoureuses, etc. (Voyez dans ce chapitre sur les variations de cellules de levure). Il s'ensuit que la composition du liquide nourricier exerce aussi son influence. Une condition

nécessaire par conséquent dans des recherches méthodiques et comparées de ce genre est, que les cellules soient toujours préalablement cultivées de la même manière. Dès que l'on varie ces conditions ex-

Fig. 43^c

térieures, il faut en même temps déterminer d'une manière correspondante les limites pour les réactions des espèces.

Ces expériences de Hansen nous ont fourni un caractère important pour la détermination des espèces de *Saccharomyces*.

Le même savant trouva un nouveau caractère distinctif des espèces dans *la différente structure anatomique des spores*. Dans l'analyse complète d'une espèce de *Saccharomyces*, on doit donc nécessairement tenir compte de ces deux caractères, ainsi que de ceux qui seront indiqués dans la suite (formation des voiles, etc.).

C'est sur certaines observations faites sur les courbes de la température de la sporulation et sur la structure des spores que Hansen a basé *la méthode d'analyse de la levure basse de brasserie au point de vue pratique*, mentionnée ci-dessous. Il observa que les espèces employées dans l'industrie, celles que l'on nomme *levures de culture*, développent leurs spores à certaines températures *plus tard* que les espèces dites *levures sauvages*, dont un grand nombre sont connues dans l'industrie comme levures de maladie. Outre cela, il trouva que *la structure de la spore diffère ordinairement dans ces deux groupes*: la jeune spore de la levure de culture offre une paroi (membrane) distincte et le contenu en est irrégulier, granuleux et muni de vacuoles; dans la cellule de levure sauvage, au contraire, la jeune spore présente le plus souvent une paroi indistincte et un contenu plus réfringent et plus homogène. Il faut encore ajouter que les spores des levures de culture sont ordinairement plus grandes que celles des levures sauvages.

1° Pour *contrôler pratiquement d'une manière suivie et quotidienne la levure de brasserie de fermentation basse*, on se sert, eu égard à l'infection par la levure sauvage, du procédé suivant, qui est très commode. *A la fin de la fermentation principale*, on prend dans la cuve, avec un flacon stérilisé, un petit échantillon du liquide en fermentation, on laisse reposer le flacon pendant quelques heures, jusqu'à ce que la levure se soit déposée au fond, et ensuite on transporte cette levure sur un des blocs de

plâtre qui ont été décrits page 189. La culture se place dans un thermostat à 25° C. ou à 15° C.

On trouve, comme cela a été confirmé par les expériences détaillées de Holm et Poulsen, que les races de levure de culture employées dans les brasseries de fermentation basse peuvent être divisées en deux groupes : à 25° C. *un groupe* développera ses spores plus tard que la levure sauvage ; *l'autre groupe*, par contre, formera à cette même température ses spores à peu près en même temps que la levure sauvage, tandis qu'à 15° C. les cellules de la levure sauvage formeront leurs spores beaucoup plus tôt que les cellules de ces levures de culture.

On examine les cultures à 25° C. au bout de 40 heures, celles à 15° C. après trois jours.

La *levure haute des brasseries* peut, d'après nos recherches personnelles, être analysée à peu près de la même manière.

Chez quelques espèces, il est cependant préférable d'effectuer l'analyse entre 10° et 12° C. parce que ce n'est qu'à ces températures que l'on observe une différence notable de temps dans le commencement de sporulation de la levure de culture et des levures sauvages.

D'après les recherches de l'auteur de ce livre, la *levure de distillerie* peut être analysée de même. Dans cette analyse, il faut ordinairement choisir les basses températures ; mais souvent il faut encore tout d'abord tenir compte de la *Structure de la spore* chez le type de levure choisi, parce que la différence de temps pour la formation des spores de la levure de culture et des levures sauvages n'est, dans bien des cas, que peu considérable aux températures indiquées.

Quant à la levure de vin, il sera possible, comme *Aderhold* le fait ressortir, de faire l'analyse d'après un procédé analogue à celui que *Hansen* indiqua pour la levure de bière.

Des expériences exécutées par *Holm* et *Poulsen* dans le but de déterminer jusqu'à quel point la méthode analytique de *Hansen* pouvait suffire pour les recherches, telles qu'on les effectue dans la pratique de la fermentation basse, eurent pour résultat qu'on arrivait ainsi à déceler avec certitude même une très petite addition de levure sauvage, environ $1/200$ de la masse entière de la levure (levure basse de *Carlsberg* n° 1). *Hansen* a démontré par des expériences antérieures que quand, par exemple, les deux espèces *Saccharomyces pastorianus* III et *Saccharomyces ellipsoideus* II, qui toutes deux peuvent provoquer des troubles de levure dans la bière, étaient mélangées au levain dans la proportion de seulement $1/41$, la maladie ne pouvait pas se produire, en supposant que la fermentation et la conservation se fassent d'une manière normale. En outre, il a prouvé que le *Saccharomyces pastorianus* I, qui donne à la bière une odeur désagréable et un goût amer, n'était pour ainsi dire plus capable de produire cette action nuisible, toutes choses égales d'ailleurs, si l'addition de cette levure au levain comportait moins de $1/22$. Par conséquent, une analyse basée sur la sporulation, suivant la méthode de *Hansen*, pourra fournir des renseignements suffisants.

Cette méthode présente en outre l'avantage que l'analyse peut être exécutée avec des mélanges tels qu'en offre le levain de brasserie, et cela en peu de temps.

Dans l'analyse détaillée qui a pour but de faire distinguer plus exactement les différentes espèces contenues dans l'échantillon, on isole par ensencement fractionné une série de cellules, et les cultures qui s'en développent s'examinent isolément (Voir page 185).

Un examen de la levure basse pendant les différentes phases de la fermentation principale montre, comme *Hansen* l'avait déjà indiqué en 1883, que ce n'est que dans les dernières phases de la fermentation principale que les

espèces de levures sauvages apparaissent ordinairement avec de jeunes cellules dans les couches supérieures du liquide, en nombre plus considérable. *Les échantillons du liquide qu'on sort de la cuve pour l'analyse de la levure doivent donc, comme il est dit plus haut, être pris dans les derniers jours de la fermentation.* S'il se passe un certain temps avant que la levure puisse être analysée, il faut toujours l'introduire préalablement dans du moût et lui faire faire une ou plusieurs fermentations complètes, peu importe qu'elle se trouve à l'état sec ou humide.

Suivant des recherches de l'auteur de ce livre concernant la *levure haute en brasserie*, il est de règle que les espèces de levures sauvages n'apparaissent que dans les phases plus avancées de la fermentation, comme cela a été établi par de nombreuses analyses de bières provenant de brasseries danoises, anglaises et allemandes. Comme on sait, cette apparition de levure sauvage dans la fermentation haute anglaise, donna lieu à la supposition erronée que ces espèces étaient nécessaires à l'accomplissement d'une fermentation secondaire normale. Les assertions que l'on avançait d'un autre côté, à savoir que dans la fermentation haute de brasserie, les levures sauvages ne se présentaient pas en quantité notable, reposent sur des observations inexactes (1),

(1) L'observation faite sur de la levure basse, mentionnée ci-dessus, a été confirmée par M. J. Vuylsteke. Il produisit des fermentations de mélanges de différents *Saccharomyces* dans des vases de verre cylindriques contenant chacun environ 2 litres et il détermina par des numérations et des cultures les rapports des différentes espèces entre elles. Pour des mélanges de *levures hautes* et d'espèces sauvages, la règle mentionnée n'est suivant les expériences faites dans les conditions indiquées par M. J. Vuylsteke, pas applicable d'une manière générale. Ainsi, dans quelques essais faits avec des mélanges de *Saccharomyces cerevisiae* I Hansen, et de *Saccharomyces pastorianus* I Hansen, on observa une augmentation, dans d'autres essais une diminution des levures sauvages vers la fin de la fermentation

Il va de soi que l'analyse de la levure, quelque précieuse qu'elle soit, ne conserve jamais qu'une importance secondaire dans l'industrie : l'article le plus important du système sera toujours, en tous cas, l'emploi de la race de levure choisie et cultivée à l'état pur.

2° L'analyse de *la levure dans l'appareil propogateur*, où elle doit se trouver absolument pure, s'effectue de la manière suivante : à la fin de la fermentation, on sort avec précaution des échantillons avec des ballons Pasteur ou avec des flacons de Hansen, dont on se sert pour l'expédition de la levure et qui ont été décrits page 26 ; on introduit des parcelles de ces échantillons dans des ballons avec de l'eau de levure neutre ou faiblement alcaline ou avec de l'eau de levure et de la dextrose, et l'on soumet celui-ci à la température d'environ 25° C. pour l'examen bactériologique de la levure. On laisse le reste en repos pour que la levure se dépose, puis on décante la bière et l'on introduit des échantillons du dépôt pris au hasard dans une solution de sucre de canne acidulée avec de l'acide tartrique (1-4 0/0). Après trois ou quatre cultures dans une pareille solution, on introduit la levure plusieurs fois dans du moût de bière, puis on observe la sporulation. Les plus légères traces de levures sauvages dans l'appareil obtiennent, par ce traitement, un fort développement (1).

principale. Par contre, toutes les expériences faites avec des mélanges de *Saccharomyces cerevisia I* et de *Saccharomyces pastorianus III* montrèrent que l'infection dans les couches supérieures du liquide était plus forte à la fin de la fermentation qu'au début, c'est-à-dire comme c'est le cas dans la fermentation basse

(1) Il est évident que cette méthode ne peut être employée à l'analyse ordinaire de la levure industrielle, parce que les cultures en solution tartrique feraient sensiblement augmenter les cellules des levures sauvages, ce qui rendrait impossible à l'analyste de se rendre compte du degré d'infection.

e. — *La formation des voiles.*

En observant la formation des voiles des *Saccharomyces*, Hansen a trouvé, par une toute autre voie que dans le cas qui vient d'être mentionné, des signes caractéristiques pour les différentes espèces. Cela ouvrit encore un chemin tout nouveau à l'étude de ces champignons, car les indications qui nous ont été fournies jusqu'à présent sur ce sujet s'écartaient absolument de la vraie nature biologique.

Un phénomène bien connu est que *des liquides fermentés se couvrent d'un voile*. On sait que ce furent principalement les voiles formés par des champignons bourgeonnants — *Mycoderma cerevisiæ*, *Mycoderma vini* — qui attirèrent l'attention, et la fréquence avec laquelle on fit mention de ces voiles dans la littérature, eut un effet qui retrouve son pareil dans d'autres domaines : on a discuté sur ces voiles comme sur un sujet connu, de sorte qu'on a fini par croire qu'on le connaissait véritablement. Maintenant que Hansen a soumis la question à un examen expérimental, on s'aperçoit qu'on était dans l'erreur.

Hansen a étudié un grand nombre de voiles, entre autres certaines formes qui se rapprochent le plus de plusieurs espèces de « *Saccharomyces Mycoderma* » qui ne forment pas de spores endogènes. Suivant de Seynes, Reess et Cienkowski, ces espèces de *Mycoderma* formeraient des ascospores : il est cependant très probable que ces observateurs avaient sous les yeux des voiles impurs entremêlés de véritables *Saccharomyces*. La détermination du degré de pureté d'une telle culture ne présente pas peu de difficultés, quand on ne prend pas comme point de départ une cellule *unique* ; car lorsque le

Mycoderma cerevisiæ fut cultivé comme levure de dépôt, les cellules prirent un tout autre aspect. Elles contenaient plus de plasma, tandis que les cellules des voiles sont, comme on sait, pauvres en plasma, avec des vacuoles fortement développées. Ces formes, que l'on considère ordinairement comme appartenant au *Mycoderma cerevisiæ*, développent facilement et rapidement des voiles, quelques-unes manifestent en même temps des phénomènes fermentatifs visibles, d'autres n'en manifestent point. Sur la bière et le moût, ces voiles sont grisâtres, secs, plus tard ils prennent des plis et affectent une couleur plus claire; il y a beaucoup d'air qui se trouve emprisonné entre les cellules. Quelques-unes des formes de *Torula* examinées par Hansen, forment des voiles semblables; par contre, le voile formé par la *Chalara mycoderma* est visqueux, dur et un peu brillant. La formation des voiles de *Monilia*, qui, comme cela a été dit précédemment, peut se présenter avec des cellules bourgeonnantes, est particulière: déjà pendant la fermentation vigoureuse, il se forme sur les bulles d'acide carbonique un voile, qui s'étend ensuite sur toute la surface en formant parfois des plis. Dans le ballon, les cellules tombent donc d'abord comme levure de dépôt, provoquent une fermentation active et remontent enfin avec les bulles d'acide carbonique à la surface où elles entrent dans une nouvelle phase de développement. Si de la bière de garde stérilisée est infectée par ce champignon, il ne se manifeste aucune fermentation, et il apparaît seulement un voile mince semblable à de la poussière. Soumis à d'autres conditions, le champignon forme une couche d'un blanc de farine et cotonneuse comme l'oidium.

Chez les Saccharomyces proprement dits, il se forme également des voiles, mais quelque peu différents de ceux qui ont été mentionnés plus haut. Tel est le cas pour quelques-uns des Torulas de Hansen et pour le « Saccharomy-

ces apiculatus ». D'après cette observation, la formation des voiles ne doit pas être envisagée comme un phénomène propre à certaines espèces, mais bien *comme un phénomène qui se produit pour tous les microorganismes en général*.

Dans les espèces de *Saccharomyces*, cette formation se présente généralement de la manière suivante: lorsqu'on expose sans les déranger, des cultures dans du moût pendant un temps plus ou moins long, à la température ordinaire des appartements, il apparaît à la fin de la fermentation principale, peu à peu, à la surface du liquide, de petites taches de levure, celles-ci peuvent plus tard se rassembler pour former des figures d'aspect et de grandeur différentes, ou des flots, dont la partie supérieure est plane et la partie inférieure convexe. Finalement, ces taches se réunissent et constituent un voile continu, gris-jaune, mucilagineux, qui peut se propager jusqu'aux parois du verre et y former un anneau entier. Une formation de voiles aussi complète ne peut avoir lieu que lorsque la fermentation principale est terminée. Si l'on secoue le ballon, des fragments isolés du voile se détachent, *tombent au fond*, et de cette manière, il peut se former peu à peu tout un dépôt, pendant que le voile se renouvelle. Ce dernier prend un aspect marbré, vu que les parties plus jeunes sont minces et foncées, les anciennes au contraire épaisses et claires.

La condition essentielle pour que le voile puisse se former est que la *surface soit pure et immobile*, en contact direct avec l'atmosphère; une formation vigoureuse de voiles suppose d'ailleurs une affluence abondante de l'air. La fonction de la formation des voiles est donc soumise dans ce sens aux mêmes conditions que la formation endosporée.

Simultanément avec la formation des voiles, il se produit une décoloration du moût, qui devient jaune clair.

Cette réaction apparaît le plus rapidement à des températures élevées, et de la manière la plus frappante chez les espèces qui produisent la plus vigoureuse formation de voiles.

La culture préliminaire des cellules est la même que celle qui a été décrite précédemment (p. 187). On décante le liquide de la végétation développée et on y ajoute du nouveau moût stérilisé. On transporte — avec les mesures de précaution d'usage — une goutte du mélange de levure et de moût secoué préalablement dans des ballons d'une capacité d'environ 150 centimètres cubes remplis à moitié de moût et coiffés de papier à filtrer. *Hansen* exposa ces ballons à différentes températures et il détermina :

1° Les limites de la température pour la formation des voiles ;

2° Le moment de leur apparition à différentes températures ;

3° L'aspect microscopique des végétations à ces différentes températures.

Le point capital dans ces études sur les six espèces mentionnées précédemment, est l'*aspect microscopique de leurs voiles à températures égales*, et nous obtenons ici de nouveau, à un point de vue différent de celui dont nous sommes partis précédemment, un examen complet de la relation qui existe entre les facteurs actifs et les formes, examen qui nous montre que nous sommes en présence d'autant de types ou d'espèces différentes par leur nature intérieure.

L'examen du voile a lieu, à moins d'indication contraire, lorsqu'il est assez développé pour pouvoir être déjà vu à l'œil nu.

En considérant les figures représentant ces végétations de voiles (voir pages 246 et les suivantes) on reconnaît aussitôt que le caractère général des végétations de voi-

les est ordinairement tout différent de celui de la levure déposée. Ainsi la forme du dépôt est pour le *Sacch. cerevisiæ* I ovoïde ou sphérique, mais dans les voiles apparaissent bientôt des cellules allongées, et peu à peu la végétation prend un aspect qui diffère complètement de celui de la levure déposée.

Si nous comparons ensuite les formes de voiles des six espèces, nous trouvons que les voiles développés à des températures élevées ne sont que d'un faible secours dans l'examen, car il n'y a ici que le *Saccharomyces cerevisiæ* I et le *Saccharomyces ellipsoideus* II qui se distinguent des autres espèces. Il en est cependant tout autrement quand on observe les jeunes voiles à 13-15° C. Les deux espèces *Saccharomyces pastorianus* II et *Saccharomyces pastorianus* III, qui toutes deux sont des levures de fermentation haute, et dont les cellules en culture ordinaire ne peuvent, avec certitude, être distinguées l'une de l'autre, apparaissent ici avec des végétations toutes différentes. On trouve une différence tout aussi frappante entre les espèces *Saccharomyces ellipsoideus* I et II, qui autrement se ressemblent.

Il résulte de l'observation des limites de température pour la formation des voiles que pour le *Saccharomyces cerevisiæ* I et le *Saccharomyces ellipsoideus* I, elle s'arrête à environ 38° et à 5 ou 6° C.; pour les trois espèces du groupe *pastorianus*, les limites se trouvent entre 34° et 3° C.; le *Saccharomyces ellipsoideus* II a la même limite inférieure que ces dernières, la température maximum se trouve par contre à 38-40° C.

Les limites de temps, comparées à celles indiquées précédemment pour la sporulation, nous montrent que dans les deux cas, le développement est beaucoup plus lent à basse température qu'à des températures élevées; aux températures voisines des maxima et des minima, la formation des voiles est toujours très faible et incomplète.

Aux températures supérieures à 13° C., le voile du *Saccharomyces ellipsoïdeus* II a un développement si rapide et si vigoureux, que par ce seul fait, on peut reconnaître les ballons renfermant cette espèce. Ainsi à 22-23° C., cette espèce forme un voile qui recouvre complètement la surface du liquide au bout de 6 à 12 jours, tandis que les cinq autres espèces exigent le triple de temps pour ne former qu'un voile, qui, la plupart du temps, n'est que moins bien développé. Cette espèce et *Saccharomyces pastorianus* III donnent aussi, à la température ordinaire d'une chambre, assez rapidement, un voile prononcé, tandis que les autres espèces sont, au bout du même temps, encore bien en retard.

Comme il est dit plus haut, les formations des voiles ont des températures maxima différentes. Ceci est en connexion avec le fait, que la température maximum pour le bourgeonnement n'est pas la même pour les différentes espèces. Il a été démontré que le bourgeonnement et la fermentation peuvent avoir lieu à des températures où il n'existe plus de formation de voiles. Ainsi Hansen observa encore à 38-40° C. une fermentation et un bourgeonnement vigoureux avec les *Saccharomyces cerevisiæ* I, *Saccharomyces ellipsoïdeus* I et *Saccharomyces ellipsoïdeus* II, à 34° C. avec les trois espèces du groupe *Saccharomyces pastorianus*. Il existe donc une relation entre l'influence que la température exerce sur le bourgeonnement et la fermentation d'une part, et d'autre part celle qu'elle a sur la formation des voiles.

Dans des levures basses de brasserie et dans quelques espèces sauvages, Will a observé, dans l'anneau de levure et dans une partie des petits ilots qui apparaissent à la surface du liquide avant la véritable formation de voiles, des cellules à formes rondes ou ovales, munies d'une forte membrane et contenant un grand nombre de gouttelettes d'huile (Fig. 44). Un traitement par l'acide chlorhydrique

concentré fait séparer la membrane en deux lamelles. Dans les cultures, surtout dans des liquides nourriciers artificiels, la couche extérieure de cette membrane se détache peu à peu : ce détachement se produit quelquefois sans rupture de la couche extérieure, et alors on pourrait

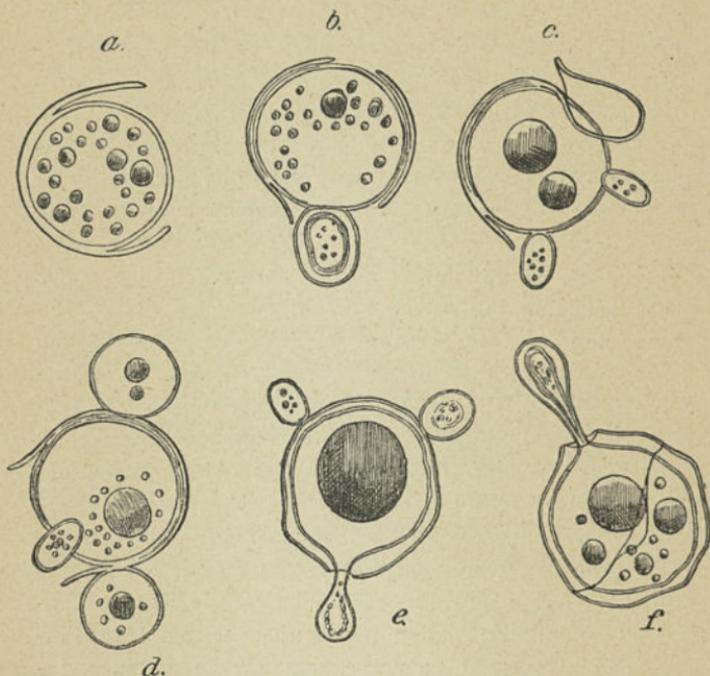


FIG. 44.

Cellules durables d'après Will.

La couche membraneuse est détachée en partie ou complètement. **a, b**, dans du moût, **c.-f.** dans une solution nutritive minérale.

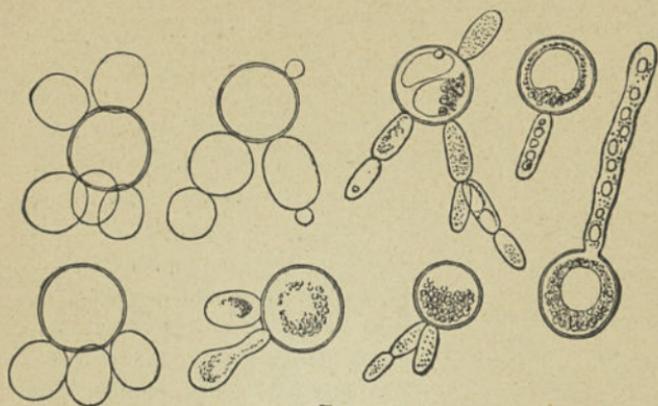
croire que deux cellules se trouvent emboîtées l'une dans l'autre. Le contenu de ces cellules est coloré en vert ou en brun par de l'acide sulfurique concentré. Il arrive aussi que ces cellules présentent, avec l'iode, la réaction glycogénique. Comme *cellules durables*, elles semblent

jouer un certain rôle dans la vie de la végétation, attendu que dans de vieilles végétations, on peut encore trouver celles-ci en vie, tandis que la plupart des autres individus ont péri. Dans des milieux artificiels contenant des sels minéraux, du sucre et de l'asparagine, avec addition d'acide citrique ou tartrique, ces cellules durables apparaissent aussi dans la végétation du dépôt. Elles développent des cellules de levure sphériques ou allongées, soit isolées ou réunies en grand nombre (Fig. 43 A). C'est principalement dans de vieilles cultures de cellules durables, produites dans des milieux minéraux, que la germination donne naissance à des cellules claviformes avec formation de cloisons, et ce phénomène peut se répéter dans les générations ultérieures (Fig. 43 B). Dans la germination sur milieu solide, *Will* observa aussi une séparation de ces cloisons (Fig. 43 B).

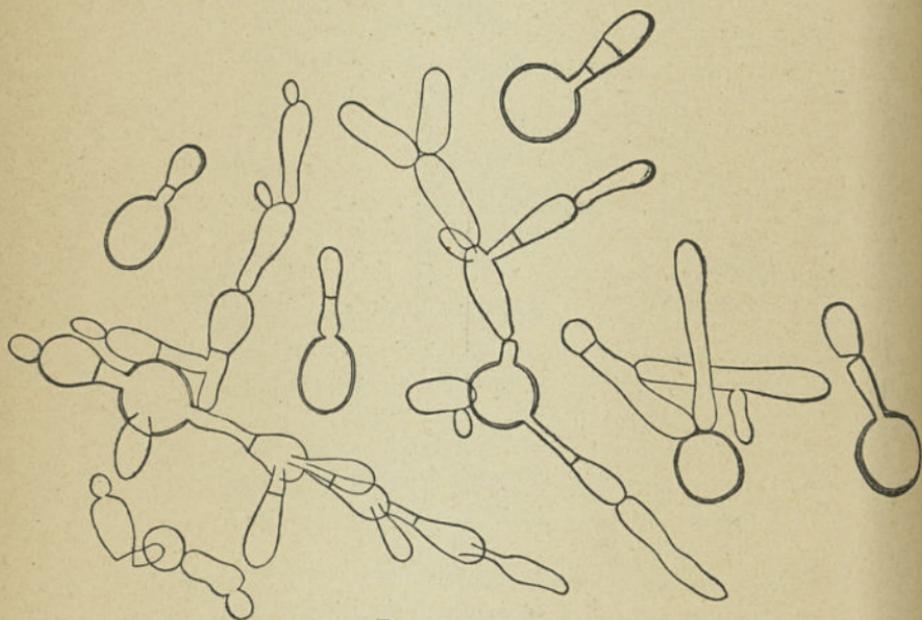
d. — *Les limites des températures pour les espèces de Saccharomyces.*

De même que les températures jouent des rôles inégaux dans le développement des spores et des voiles des différentes espèces, de même aussi les expériences de Hansen (1883) ont prouvé que les spores ainsi que les cellules végétatives avaient, dans les différentes espèces, des forces de résistance inégales contre l'échauffement dans l'eau. Les spores sont, sous ce rapport, plus résistantes que les cellules végétatives.

Pour des déterminations de ce genre, l'état des cellules a, comme dans les cas mentionnés précédemment, une très grande influence. Le résultat dépend, en particulier, beaucoup de l'âge des cellules et varie selon qu'on opère sur de vieilles ou sur de jeunes cellules. Ainsi on ob-



A.



B.

FIG. 45.

Cellules durables d'après Will

- A. Forme germinative ordinaire.
- B. Cellules durables avec des cellules-filles claviformes ou en forme de boudins, dont l'intérieur est cloisonné.

serva que les cellules du *Sacch. ellipsoideus* II, prises d'une culture dans du moût de deux jours à 27° C., étaient détruites au bout de 5 minutes en les soumettant à 56° C. de chaleur dans de l'eau distillée stérilisée, tandis que des cellules d'une même culture, mais âgée de deux mois et demi, résistaient pendant 5 minutes à une température de 60° C.

Des spores mûres de cette espèce, développées à 17-18° C. et séchées en partie pendant huit jours à la même température, supportèrent un chauffage à 62° C. prolongé pendant cinq minutes, mais non à 66° C.

Les cellules végétatives du *Saccharomyces cerevisiæ* I, dans de semblables conditions, périclissent en cinq minutes, lorsqu'elles sont soumises à l'influence d'une température de 54° C., tandis que les spores ne sont tuées qu'à 62° C.

Un groupement intéressant des six espèces de Hansen (page 245 et les suivantes) d'après une température déterminée, se présente également, lorsqu'elles sont cultivées dans du moût, dans des conditions favorables à la formation des voiles (page 207). Quand le développement a lieu à 36-38° C., les trois espèces *pastorianus* sont tuées au bout de 11 jours, tandis que le *Saccharomyces cerevisiæ* I, et les deux espèces ellipsoïdes sont encore en vie. On peut, entre autres, en conclure que la règle établie auparavant, suivant laquelle les levures de fermentation haute peuvent se développer à une température plus élevée que les levures de fermentation basse, est inexacte.

Les recherches entreprises plus tard par Kayser, dans quelques-unes des directions mentionnées plus haut confirment les résultats indiqués. On trouva aussi qu'à l'état sec les espèces supportent des températures beaucoup plus élevées qu'à l'état humide. Ainsi une espèce de levure de « pale-ale » fut tuée à l'état humide après avoir été soumise pendant cinq minutes à l'action d'une tempé-

rature de 60-65° C., tandis qu'elle supporta à l'état sec une température de 95-105° C.; pour une levure de vin (St-Émilien) la proportion fut de 55-60° C. et de 105-110° C. Pour les spores, la force de résistance augmentait encore de 10-20° C.

Les cellules végétatives dérivées des spores chauffées présentèrent une force de résistance un peu plus grande que celle des cellules végétatives normales. Mais ce surcroît de force de résistance ne se transmet pas à la descendance; en cultivant dans du moût de bière, il disparut déjà dès la deuxième génération.

e. — Culture sur un milieu nourricier solide.

Des cultures convenables sur un milieu nourricier solide, ont fourni à Hansen des caractères plus distincts pour la détermination de plusieurs espèces de *Saccharomyces*. Il employa pour cela du moût de bière avec addition d'environ 5 1/2 pour cent de gélatine dans de petits flacons bouchés avec des tampons de coton. Lorsque ces flacons sont infectés avec les six espèces connues (*Saccharomyces cerevisiæ* I, *Saccharomyces pastorianus* I-III, *Saccharomyces ellipsoideus* I et II) et placés à 25° C., il se produit dans l'espace de 11 à 14 jours, dans les végétations en voie de développement, de telles différences visibles à l'œil nu, qu'on parvient à distinguer quatre classes plus ou moins différentes l'une de l'autre. Le *Saccharomyces ellipsoideus* I fait exception; sa surface de végétation se distingue par une structure particulière, en forme de réseau, de sorte que cette espèce peut être discernée des autres à l'œil nu. Si on emploie dans de semblables cultures, de l'eau de levure avec de la gélatine, en opérant à 15° C., on verra que le *Saccharomyces pastorianus* II forme,

au bout de 16 jours, des végétations avec des bords assez unis, tandis que les bords du *Saccharomyces pastorianus* III, appararaltront velus. Il résulte, dans ce cas, de l'examen microscopique, que les deux espèces peuvent aussi être distinguées morphologiquement. Mais ceci n'est pas du tout toujours le cas pour les cultures sur un milieu nourricier solide ; souvent même on trouve dans ces conditions, des différences moins grandes qu'avec des cultures dans des liquides nourriciers.

Pour les espèces de *Mycoderma* et le *Saccharomyces membranæfaciens*, Hansen a trouvé, comme il est indiqué dans la description de ces espèces, des caractères très significatifs pour leur état dans du moût gélatinisé où leurs colonies, à l'opposé de celles des *Saccharomyces*, s'étendent en forme de bouclier.

Il faut encore mentionner ici l'observation qu'il fit sur quelques espèces (par exemple *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii*) qui peuvent former sur un milieu solide un mycélium, à l'opposé d'autres qui n'en sont pas capables.

Pour quelques levures de culture, P. Lindner trouva les différences notables dans leurs végétations sur gélatine.

En examinant les images sur gélatine de végétations d'espèces de levures ellipsoïdes provenant de vins allemands, Aderhold observa, dans les cultures par piqure et dans celles par gouttes, des différences entre deux types. L'un montrait des colonies renfoncées en forme d'entonnoir, à dessin nettement concentrique, tandis que l'autre avait des végétations de structure concentrique à peine proéminente, mais avec des rayements radiaires très prononcés.

L'extrême variabilité des caractères distinctifs qui se manifeste dans des cultures sur de la gélatine nutritive, a aussi été démontrée, entre autres par Will.

Un grand nombre d'espèces *liquefient* la gélatine nutri-

tive. En 1890, ceci a été constaté par l'auteur de ce livre, pour la levure de brasserie. Des observations analogues ont été faites plus tard pour diverses autres espèces de levures, par *Will*, *Wehmer*, *Fischer* et d'autres chercheurs.

F. — *Action des Saccharomyces et des levures ressemblant aux Saccharomyces sur les sucres et autres constituants du liquide nourricier. Maladies de la bière.*

La première preuve convaincante de l'action très variée que peuvent exercer les différentes espèces de *Saccharomyces* dans le liquide nourricier, nous a été fournie par des essais faits sur des cultures pures de levures qui furent plus tard examinées dans la pratique industrielle et qui, après les découvertes de Hansen en 1883, furent préparées au laboratoire de Carlsberg et plus tard dans celui de l'auteur et dans beaucoup d'autres laboratoires. Il existe des brasseries qui ont fait en grand, dans les mêmes conditions, des essais pratiques sur toute une série de races de levures, d'où il résulta que l'atténuation, le goût, l'arome, la clarification, la résistance contre les troubles occasionnés par les levures, etc., différaient absolument selon les races.

Les travaux de Hansen sur les *levures de maladies* (1883), qui ouvrirent des horizons nouveaux, ont encore une fois mis en lumière, à un tout autre point de vue, les différences essentielles qui existent entre les divers *Saccharomyces* dans leur action sur le liquide nourricier. Car elles établissent parmi les levures dites sauvages, des groupes qui *provoquent des changements préjudiciables dans la bière*, et d'autres qui, au contraire, *ne causent aucune altération*. Parmi les premiers, il en existe de nouveaux

qui communiquent à la bière un goût amer et une odeur désagréable (*Saccharomyces pastorianus* I), ordinairement sans la troubler, tandis que d'autres ne manifestent entièrement leur action qu'à la fin de la fermentation secondaire en troublant la bière (*Sacch. pastorianus* III et *Sacch. ellipsoideus* II) qui, après le soutirage, laissent au bout d'un temps relativement court, un fort dépôt de levure que la moindre secousse fait remonter dans le liquide. Ce n'est que lorsque ces espèces — *Sacch. pastorianus* I, *Sacch. pastorianus* III et *Sacch. ellipsoideus* II — sont introduites dans le moût au début de la fermentation, qu'elles peuvent produire la maladie. Une addition de levure de maladie à la bière dans les foudres ou à la bière soutirée, n'a aucune action sensible ; ce n'est que lorsque l'infection de la bière en bouteilles par le *Sacch. ellipsoideus* II est excessivement forte que son influence pourra se faire sentir. Le résultat principal est que le principe de cette contagion se trouve dans le *levain*. Elle a présenté aux brasseries de très grandes difficultés et leur a fait subir de fortes pertes d'argent. Les observations de Hansen ont été en partie confirmées, en partie complétées par de nouveaux exemples dus à Grönlund, Will, Lasché, Kokosinsky, Krieger, Windisch et Lindner.

Dans les brasseries à fermentation haute, les levures sauvages peuvent également susciter des troubles. C'est ainsi que, suivant de Bavay, le « *summercloud* » des brasseries australiennes (brasseries de fermentation haute), serait occasionné par un *Saccharomyces*. La bière est troublée par cet organisme et prend un goût acide et amer.

L'auteur de ce livre a trouvé, dans des bières de fermentation haute anglaises, des levures appartenant au *Saccharomyces anomalus* qui provoquaient des troubles ; dans des bières hautes danoises peu fermentées se pré-

sentèrent des espèces de *Torula* avec les mêmes propriétés.

Dans la lie des foudres d'une brasserie, Lafar découvrit un *Mycoderma* produisant la formation d'acide acétique.

Tout récemment, Pichi a aussi trouvé des levures de maladies dans le vin.

Les moisissures peuvent exercer des actions variées sur les sucres et les recherches très étendues de Hansen ont démontré que dans ce sens là on pouvait aussi trouver, pour divers *Saccharomyces* et autres champignons qui leur ressemblent, des *critériums caractéristiques*. Pour terminer, nous mentionnerons ici, à côté des *Saccharomyces* proprement dits, le *mycoderma cerevisiæ*, le *Sacch. apiculatus*, les formes de *Torula* et la *Monilia*.

Hansen a étudié l'action d'un grand nombre de levures sur les quatre sortes de sucres : saccharose, maltose, lactose et dextrose.

Ces six espèces connues de *Saccharomyces* (*Sacch. cerevisiæ* I, *Sacch. pastorianus* I, II et III, *Sacch. ellipsoideus* I et II) agissent de la manière suivante : elles secrètent toutes de l'invertine, transforment la saccharose en sucre interverti, lequel fermente ensuite ; elles font également fermenter la maltose et la dextrose, mais non pas la lactose. Toutes les levures de fermentation basse employées dans l'industrie, ont la même action sur ces quatre sortes de sucre.

Le *Sacch. Marxianus*, le *Sacch. Ludwigii* et le *Sacch. exiguus* ne font pas fermenter la maltose et la lactose ; ils intervertissent la saccharose et font fermenter des solutions nourricières de sucre interverti et de dextrose (1).

(1) D'après les recherches d'Emile Fischer, la maltose ne serait pas directement fermentée, mais d'abord intervertie par un enzyme spécial. La plupart des espèces connues de Saccharo-

Le *Sacch. membranæfaciens* et le *Mycoderma cerevisiæ* ne possèdent pas de ferment intervertissant et ne font pas fermenter les sucres mentionnés (1).

Le *Sacch. apiculatus* n'intervertit pas la saccharose ; des quatre sucres il ne fait fermenter que les solutions de dextrose. Dans du moût de bière, il ne provoque par conséquent qu'une faible fermentation alcoolique.

Parmi les formes de *Torula* examinées par Hansen, il en existe beaucoup qui ne peuvent pas sécréter de l'invertine et faire fermenter la maltose, et ne produisent dans du moût de bière qu'environ 1 0/0 d'alcool en volume. D'autres espèces intervertissent la saccharose. Dans des solutions nourricières de dextrose, les différentes espèces suscitent des fermentations plus ou moins fortes.

La *Monilia candida* ne possède aucun enzyme intervertissant soluble dans l'eau, fait fermenter la saccharose, la maltose et la dextrose. Dans du moût de bière, elle suscite une fermentation, mais à la température ordinaire de la chambre, elle n'arrive — en comparaison des *Saccharomyces* — que très lentement à des doses d'alcool plus élevées.

Dans le lait, on a trouvé divers champignons bourgeonnants. *Grotensfelt* et l'auteur de ce livre constatèrent la présence de *Saccharomyces*, *Duclaux*, *Adametz*, *Kayser* et *Beijerinck* ont décrit différents *Saccharomyces*. Ils *dédoublent tous le sucre de lait*. C'est en vain qu'on les a cherchées jusqu'à présent dans les brasseries.

myces possèdent ainsi l'enzyme intervertissant du sucre de canne et celui de la maltose. Par contre, les trois espèces : *Sacch. Marxianus*, *S. Ludwigii* et *S. exiguus* n'ont que l'enzyme intervertissant du sucre de canne.

(1) D'après les recherches de Lasché, il existe parmi les espèces de *mycoderma* qui se trouvent dans la bière, plusieurs qui peuvent provoquer une fermentation alcoolique.

Fermi a observé que certaines levures blanches et rouges peuvent exercer une action *diastatique*. *Morris* arriva à des résultats analogues par des expériences faites avec de la levure pressée.

En résumant tous ces différents rapports entre les *Saccharomyces*, nous voyons qu'ils se divisent en deux grands groupes :

I. Ceux qui possèdent un enzyme intervertissant et provoquent une fermentation alcoolique. Ce groupe se divise encore en deux, à savoir :

(a) Ceux qui font fermenter vigoureusement non seulement la saccharose et la dextrose, mais aussi la maltose (les six premières espèces de Hansen et les espèces de levures employées dans la brasserie).

(b) Ceux qui font fermenter la saccharose et la dextrose, mais non pas la maltose (*Sacch. Marxianus*, *Sacch. Ludwigii* et *Sacch. exiguus*).

II. Ceux qui ne possèdent pas d'enzyme intervertissant et ne provoquent pas de fermentation alcoolique (*Sacch. membranifaciens*).

Les levures sans formation d'endospores (*non-Saccharomyces*) offrent, à l'égard du pouvoir intervertissant et de la fermentation, les combinaisons les plus diverses :

I. La plupart ne font pas fermenter la maltose. Un grand nombre d'entre eux provoquent dans des solutions de dextrose et de sucre interverti des fermentations plus ou moins vigoureuses. Quelques-uns (formes de *Torula*) intervertissent la saccharose; beaucoup ne possèdent pas de ferment intervertissant (*Mycoderma cerevisiae*, formes de *Torula*, *Sacch. apiculatus*).

II. Une seule espèce (*Monilia candida*) fait fermenter la maltose ainsi que la saccharose et la dextrose, mais ne possède pas de ferment intervertissant soluble dans l'eau.

Les *Saccharomyces fermentant la lactose* et les *Torula* occupent une place particulière.

Ceci nous apprend, comme Hansen le fait ressortir, que les *Saccharomyces* ne peuvent plus être caractérisés sans réserve comme ferments alcooliques.

En considérant le rôle des champignons sus-mentionnés dans l'industrie, nous reconnaissons immédiatement que ce n'est que parmi le genre *Saccharomyces* que l'on trouve des espèces qui font fermenter rapidement et fortement la maltose. Les brasseries et distilleries doivent donc chercher leur levure parmi les véritables *Saccharomyces*. Les *non-Saccharomyces*, dont le plus grand nombre ne fait pas fermenter la maltose, arriveront difficilement à jouer un rôle important dans ces industries. Ils pourront, par contre, être utilisés dans la préparation des vins de raisin et du cidre, attendu que plusieurs des espèces mentionnées peuvent exercer dans des solutions de dextrose et de sucre interverti une activité fermentative aussi énergique que celle des *Saccharomyces*.

Il ressort clairement de la classification précédente, qu'il faut toujours *faire choix de l'espèce convenable*.

Dans la *chimie analytique*, lorsqu'il s'agit d'analyser des solutions contenant plusieurs sortes de sucres différentes, ces rapports des différentes espèces de levures entre elles ont une importance particulière. Hansen émit principalement l'opinion que par cette voie on devait aussi arriver à obtenir un dosage plus exact des différentes espèces de sucre contenues dans le moût. Dans ces derniers temps, plusieurs chimistes se sont occupés de cette question, sans cependant obtenir jusqu'à présent une solution satisfaisante.

La description de l'*isomaltose* préparée synthétiquement, nous donne un bel exemple de l'emploi de l'analyse biologique. Comme on sait, *Emile Fischer* découvrit cette espèce de sucre, en faisant agir à basse température de l'acide chlorhydrique concentré sur de la glycose ; on la nomma isomaltose, parce que sa constitution semblait se

rapprocher beaucoup de celle de la maltose. Cependant ce sucre n'a encore jamais été préparé à l'état de pureté et n'est connu que sous forme d'un osazone. Plus tard, *C. J. Lintner* communiqua qu'il avait trouvé l'isomaltose dans de la bière et donna ensuite la description de sa formation par l'hydrolyse de l'amidon; mais *Brown* et *Morris* objectèrent à cet auteur que l'isomaltose n'existe pas parmi les produits de transformation de l'amidon, et que la substance décrite par *Lintner* comme isomaltose, n'était autre que de la maltose, souillée par des produits de transformation de l'amidon analogues aux dextrines. *Lintner* n'a pas réussi, jusqu'à présent, à fournir de nouvelles preuves à l'appui de son assertion. De même a-t-on mis en doute l'existence de l'isomaltose de *Fischer*, obtenue par synthèse, que l'on considérait également comme étant de la maltose impure; de nouvelles expériences lui permirent cependant de démontrer par la même voie biologique, que ce sucre différait essentiellement de la maltose, que l'isomaltose n'est ni fermentée par la levure fraîche ni dédoublée par les enzymes de la levure, et il fait ressortir que ce n'est que par cette voie qu'il est possible d'affirmer avec certitude la disparité de ces deux espèces de sucre.

Les actions variées des espèces de *Saccharomyces* sur le même liquide nourricier (moût de bière, moût de vin) et dans les mêmes conditions, ont été étudiées par *Borgmann*, *Amthor* et *Marx*.

Les fonctions chimiques des deux espèces de levure basse de *Carlsberg* n° 1 et n° 2 dans le moût de bière sont, suivant les recherches de *Borgmann*, très différentes. Avec ces deux espèces, après qu'elles eurent été employées pendant quelque temps dans la cave de fermentation, et pendant qu'elles étaient encore essentiellement pures, on mit en levain deux cuves en ardoise qui contenaient du moût du même brassin. Les fermentations s'effectuèrent dans des conditions permettant une comparai-

son sûre. Le séjour dans la cave de garde se fit comme d'habitude. Les différences dans le travail chimique ressortirent principalement des quantités d'acide libre (dans 100 centimètres cubes de n° 1 : 0,086 ; de n° 2 : 0,144, calculé comme acide lactique) et de la dose de glycérine trouvée dans la bière (n° 1 : 0,109, n° 2 : 0,137.

En se basant sur ces analyses, Borgmann fait la remarque que dans les deux bières, la proportion entre l'alcool et la glycérine est autre que dans les bières que l'on analyse d'ordinaire, attendu que les analyses antérieures donnèrent :

	Alcool	Glycérine
Maximum.....	100	5.497
Minimum.....	100	4.140

tandis que les bières de Carlsberg offrirent les proportions suivantes :

N° 1		N° 2	
Alcool	Glycérine	Alcool	Glycérine
100	2.63	100	3.24

On voit par là, comme Borgmann le fait d'ailleurs remarquer, que dans une fabrication irréprochable, on peut produire de bonnes bières, dont la proportion de l'alcool à la glycérine peut se trouver encore au-dessous du minimum admis autrefois.

Une série de huit espèces différentes de *Saccharomyces*, parmi lesquelles six espèces de levures de culture, toutes absolument pures, furent développées dans du moût par Anthor, pour y être examinées au point de vue de leurs fonctions chimiques. Ses résultats ne font que confirmer de nouveau le principe de Hansen, qu'en pratique il faut toujours faire un choix. Les fermentations s'opérèrent dans des ballons Pasteur d'un litre, dans des conditions entièrement identiques, et en deux séries, dont la première correspondait à la fermentation principale,

la secondé en même temps à la fermentation secondaire, On détermina la quantité d'alcool, la quantité d'extrait, le poids spécifique, le degré de fermentation, la glycérine, l'azote, la substance réductrice et le degré de coloration dans les moûts fermentés. Les tableaux qui furent dressés montrèrent, comme le fait remarquer l'auteur, des différences sensibles dans l'action chimique produite par les diverses espèces. Ainsi, la quantité d'alcool en volume contenue dans les moûts fermentés varia entre les limites 4,34 et 6,02 (3,55-5,94 après la fermentation principale), la quantité d'extrait se trouvait entre 8,27 et 11,23 (8,49 à 12,61 après la fermentation principale), le degré d'atténuation était entre 36,7 et 53,3 (28,8-52,1 après la fermentation principale); la quantité de glycérine offrit des différences frappantes et balançait entre 0,08 et 0,15; les quantités d'azote, de substance réductrice et en partie le degré de coloration montrèrent également une variabilité considérable.

Hiepe fit d'intéressantes comparaisons entre l'action d'un certain nombre de levures de culture et de levures sauvages sur les sucres, en effectuant des fermentations avec des solutions de sucre de canne additionnées d'eau de levure. Il préleva le premier échantillon cinq minutes après la mise en fermentation, puis d'autres échantillons chaque jour, jusqu'à ce que la fermentation se fut arrêtée. On détermina de chaque échantillon la teneur 1. en sucre de canne, 2. en extrait fermenté, 3. en dextrose fermentée, et 4. en lévulose fermentée. Dans ces quatre directions surgirent de très grandes différences spécifiques. Ainsi au bout de cinq minutes une levure haute anglaise avait interverti 1,95 0/0 de sucre, tandis qu'une levure basse de la collection de l'auteur de ce livre en avait interverti 58,85 0/0. Deux levures basses de brasserie intervertirent complètement le sucre de canne en 24 heures, tandis que ce travail demanda 11 jours au *Sacch. exiguus*. Chez les

autres espèces, le laps de temps nécessaire se trouvait entre ces limites. Les tableaux détaillés que nous devons à *Hiepe* indiquent que la transformation successive, tant de la quantité totale d'extrait que des deux espèces de sucres mentionnées, s'effectue d'après une échelle variant suivant l'espèce. Un examen des nombreuses particularités des séries d'expériences montra en même temps que la fermentation de la dextrose débute généralement avec bien plus d'énergie que celle de la lévulose ; mais tandis que la fermentation de la première espèce de sucre atteint dès le second jour son maximum, celle de la lévulose ne manifeste que plus tard sa plus grande vigueur, chez plusieurs espèces même, pas avant le cinquième jour. Peu à peu les proportions des quantités de sucre détruites se rapprochent, et finalement les deux espèces de sucre disparaissent en même temps.

Les espèces de levure diffèrent aussi quant à la *quantité d'acide* produite dans le liquide nourricier. Ainsi *Prior* examina à ce point de vue les produits de la fermentation dans du moût houblonné d'un certain nombre de levures de brasserie et d'espèces sauvages, et trouva que les quantités d'acide formées variaient entre 4,7 et 10 centimètres cubes d'alcali normal au 1/10 par 100 cent. cubes de moût fermenté. Les acides organiques fixes se mouvaient entre 2,1 et 5,4 centimètres cubes, les acides organiques volatils entre 2,1 et 3,8 cent. cubes d'alcali normal au 1/10 par 100 cent. cubes de bière. Dans la règle, ces expériences permirent de constater que chez les levures de culture, les quantités d'acides organiques fixes dépassent celles des acides volatils, tandis que le contraire se présente pour les espèces de levures sauvages de Hansen (*Sacch. pastorianus* I, II et III et *Sacch. ellipsoideus* I et III), où les acides volatils l'emportent sur les acides fixes, et chez le *Sacch. pastorianus* I même de beaucoup.

Une série très importante de *Saccharomyces* que l'on rencontre dans le *moût de raisin* a été étudiée par Marx (1888), non seulement au point de vue botanique, mais encore par rapport à leur action chimique sur le liquide nourricier, après que ces espèces eurent été toutes cultivées à l'état de pureté absolue, d'après la méthode de Hansen. Le temps nécessaire à la sporulation était très différent, ainsi que le nombre de cellules qui formaient des spores et le nombre de spores contenues dans chaque cellule. En connexion avec cela, il est particulièrement intéressant d'apprendre que les espèces cultivées à l'état de pureté absolue accusaient des différences évidentes dans leur pouvoir fermentatif, dans leur faculté de produire des matières volatiles qui donnent au vin un bouquet spécial, et enfin dans la force de résistance contre plusieurs acides et contre des températures élevées. Comme les différences de goût étaient fortement prononcées pour un nombre d'espèces, Marx appuie avec raison sur l'application pratique de pareilles recherches, attendu qu'en ajoutant à du moût de vin des levures possédant des propriétés connues, on rend ainsi possible la production d'un vin qui montrera des caractères distincts au point de vue du goût, etc.

Plus tard, Amthor a aussi examiné une série de cultures absolument pures d'espèces de *levures de vin* et a trouvé des différences typiques, tant sous le rapport de la sporulation que sous celui du temps employé pour la fermentation, et enfin, il trouva aussi des différences dans la composition chimique des vins. Jacquemin, Rommier, Martinand et Rietsch en France, Müller-Thurgau en Suisse, Nathan et Wortmann en Allemagne, Forti et Pichi en Italie, Mach et Portele en Autriche, obtinrent des résultats analogues, ces auteurs ayant en partie fait leurs essais comparés en grand et dans des conditions telles que les présente la pratique.

Nous devons les recherches les plus complètes et les plus étendues sur l'action variée des espèces de levures de vin sur le moût à *J. Wortmann*. Comme résultat général de ses expériences, cet auteur mentionne que les différences dans l'action des diverses races de véritables levures de vin sont souvent si grandes qu'elles peuvent être constatées rien que par l'analyse chimique des produits de la fermentation; d'autres fois elles sont si peu sensibles qu'elles ne peuvent guère être décelées que directement par nos sens (par le goût et par l'odorat). Chaque race de levure a d'ailleurs plus ou moins quelque chose de particulier dans l'action qu'elle exerce dans chaque moût, *quelles qu'en soient la provenance ou la composition*.

Le nombre des cellules de levure naissant dans un moût donné, dépend, abstraction faite de sa teneur en substances nutritives, de la reproductibilité de la race de levure employée; cependant il est indépendant de la provenance ou de la composition de ce moût. Dans un moût donné, quelle que soit sa valeur comme milieu nourricier, une race de levure se multipliera par conséquent plus fortement qu'une autre.

La comparaison exacte de la *teneur en extrait* d'un certain nombre de vins fermentés avec trois espèces de levure différentes, donna pour résultat, que dans les mêmes moûts, la « levure de Würzburg » se montra la moins exigeante, quant à la consommation d'extrait, puis vint la levure de Joannisberg; tandis que la « levure d'Ahrweiler » en consomma le plus et fournit par conséquent les vins les plus pauvres en extrait.

L'activité spécifique des levures de vin ressort principalement dans la formation de la *glycérine*. Les trois espèces mentionnées ont été comparées dans un grand nombre de moûts de diverses provenances et toujours, la levure de Würzburg produisit plus de glycérine que les deux autres; ici la levure de Joannisberg vint avant celle

d'Ahrweiler, qui, comme nous venons de l'indiquer, consommait justement le plus d'extrait. La différence constatée ici dans le rapport chimique de ces espèces, ressortit encore plus distinctement dans les expériences mentionnées, par le fait que la levure de Würzburg s'était la moins multipliée.

La *quantité d'azote* et de *cen dre* variait dans les vins fermentés avec ces trois espèces de levure.

L'*acidité* étant plus forte dans les vins fermentés par la levure de Würzburg, chez les deux autres espèces, elle se montra presque égale.

Des essais comparatifs plus exacts, effectués avec un grand nombre d'espèces, accusèrent enfin de grandes différences quant à la *quantité d'alcool* trouvée dans le liquide; les levures qui avaient fermenté le moins de temps, fournirent les plus petites quantités d'alcool, et réciproquement.

L'auteur cité répond affirmativement à la question importante pour l'application pratique, si, chez les différentes espèces ou races de levures de vin, la formation de *matières donnant le bouquet* est constante et indépendante du caractère du moût, ayant fait l'expérience, confirmée par l'auteur de ce livre, qu'il est possible de donner à un vin un bouquet spécial, c'est-à-dire d'en améliorer le goût et augmenter la valeur, dans tous les cas où un moût médiocre, sans qualités particulières, sera mis en fermentation avec des levures pures, sélectionnées. Cette même règle s'applique aussi à l'emploi des races de levure de vin de raisin dans la fermentation des moûts de fruits ou de grains (1).

(1) La question souvent débattue de savoir si les quantités d'alcool et de glycérine formées sont *reliées par une certaine proportion*, à son intérêt tant théorique que pratique. Les essais de Wortmann, effectués avec des cultures absolument pures, donnèrent pour résultat que cette proportion était

Si un moût possède un bouquet particulier, il est évident que la race de levure que l'on ajoute ne se fera généralement pas valoir dans cette direction ; mais elle manifestera essentiellement son action par la plus grande pureté et la régularité de la fermentation. (Voir plus loin au chapitre VI).

Kayser compara également diverses races de levure au point de vue chimique, et constata qu'elles montraient des différences à l'égard de la formation d'acides volatils à des températures élevées, attendu que la quantité de ces acides augmentait chez une espèce, mais diminuait chez une autre, à mesure que le degré de chaleur s'élevait.

Basé sur des essais comparatifs effectués avec des levures de vin, *Forti* fait remarquer qu'il existe des différences typiques dans le pouvoir fermentatif des espèces, dans leur résistance aux températures élevées et dans leurs exigences quant à la quantité et la nature des substances azotées du milieu nourricier. Suivant le caractère de la fermentation, il croit pouvoir faire une distinction entre les levures de la fermentation principale ou tumultueuse et les levures de la fermentation secondaire ou lente.

Les nombreux travaux exécutés depuis 1884 au laboratoire de l'auteur, avec des cultures pures de levures alcooliques appliquées dans les diverses branches de l'industrie fermentaire, ont largement fourni l'occasion de recueillir des notions relatives à la grande différence entre l'action chimique des espèces, de leur *pouvoir différent de garder pendant la conservation les particularités* importantes pour les différents besoins de l'industrie. De nom-

soumise à de grandes variations, même chez la même race de levure, et, malgré des assertions contraires antérieures, aucune proportion déterminée ne peut être établie comme devant faire foi, par exemple pour déterminer si un vin est falsifié ou non.

breux exemples ont démontré que des caractères même faiblement marqués, qui se manifestaient par le goût ou par l'odorat, purent être retrouvés après plusieurs années de conservation rationnelle et après une nouvelle culture pure, convenablement développée, dans des conditions favorables.

g. — *Des variations dans les différentes espèces de Saccharomyces*

Les nombreuses recherches de Hansen ont démontré que les *Saccharomyces* se comportent de différentes manières, suivant les influences extérieures. Après les résultats indiqués dans les chapitres précédents, il est pleinement fondé d'établir une série, non seulement des espèces de levures dites sauvages (espèces décrites antérieurement sous les noms collectifs de *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, etc.), mais encore des espèces de levures hautes et basses nettement définies, qui sont utilisées en pratique. Il est d'une grande utilité pratique de savoir que dans des cultures dans du moût de bière, entretenues pendant plusieurs années, les espèces ne montrèrent aucune ou seulement peu de variations. Mais, en obtenant ces résultats, Hansen trouva en même temps que par un traitement convenable, il est possible de produire dans plusieurs sens des variations. Les propriétés individuelles des cellules d'une culture absolument pure peuvent, dans ce sens, également se montrer. Quelques-unes de ces variations ne sont que passagères : une culture appropriée les fait de nouveau disparaître, et l'espèce revient à son état primitif. D'autres sont plus

énergiques ; la culture n'abandonne que par un traitement convenable ses qualités nouvellement acquises. Dans quelques cas de transformation fournis par les expériences de Hansen, il n'a cependant pas été possible, même par un traitement méthodique de plusieurs années, de ramener la végétation au type primitif.

1. — Comme l'on sait, les données du temps nécessaire à l'apparition des premiers rudiments des spores dans les six espèces décrites plus haut, se basent sur la condition formelle que la végétation doit avoir été préalablement cultivée pendant 24 heures dans du moût à environ 23° C. Déjà, en même temps que Hansen indiqua, en 1883, les courbes de la température pour ces six espèces, il trouva que lorsque la végétation ne s'était développée à la température indiquée dans le moût qu'au bout de deux jours au lieu d'un jour, elle pousse ses spores plus lentement et moins abondamment qu'à l'ordinaire. Mais si, après cela, on les traite dans le moût ainsi qu'il a été décrit, l'état normal apparaît de nouveau. Nous avons donc ici l'exemple d'une variation bien peu énergétique.

2. — Dans une culture sur gélatine de la « levure basse n° 1 de Carlsberg », on trouve non seulement des cellules ovales, mais on en trouve encore d'autres qui sont allongées, de sorte qu'on serait tenté de croire, suivant Reess, qu'on se trouve en présence de deux espèces. Si l'on introduit des colonies des deux espèces, chacune séparément, dans des ballons contenant du moût, on obtiendra encore ici des végétations se composant en partie de cellules ovales, en partie de cellules de la forme « *pastorianus* ». Les expériences de Hansen démontrèrent que la végétation mentionnée en dernier lieu, continuée dans de nouveaux ballons, conserve pendant longtemps en partie des cellules allongées. Introduite dans l'appareil propa-

gateur, la végétation montra encore un mélange de telles cellules, mais si l'on introduisait la levure qu'on en obtenait dans une cuve de fermentation ordinaire, elles disparaissaient. *La variation est donc dans ce cas plus énergique; elle ne cesse que lorsque la levure a été propagée pendant une série de fermentations.*

Déjà, en 1883, Hansen a démontré que les limites indiquées par Reess pour la caractérisation de ses espèces, n'existent pas, attendu que chaque culture pure nous permet de développer les espèces établies par Rees. La forme et la grandeur des cellules de levure varient beaucoup. La forme en boudin (*Saccharomyces Pastorianus Reess*) peut facilement passer à la forme ovale (*Saccharomyces cerevisiæ, ellipsoideus, exiguus Reess*) et vice versà.

Un autre exemple dans ce même ordre d'idées est qu'un *Saccharomyces cerevisiæ* (levure basse) qui, après un développement long et pénible, avait été propagé dans du moût à 27° C. eut des cellules d'aspect ordinaire, tandis que cultivé à 7 1/2° C., la végétation donna des colonies enchevêtrées avec des ramifications ressemblant à un mycélium. On a ici un exemple intéressant de l'influence qu'exerce la température sur la forme.

3. — Comme exemple bien plus accusé d'un changement dans la nature des cellules, on peut mentionner ses observations sur le *Saccharomyces Ludwigii*. Lorsque l'on soumet les individus isolés d'une culture absolument pure de nouveau à un élevage, chacun pris isolément à l'état de pureté, on peut obtenir des végétations montrant des dispositions très différentes pour la formation des spores. Par un choix méthodique des cellules individuelles, Hansen réussit à produire des végétations qui, dans les circonstances connues, ne développèrent pas du tout de spores. Contrairement à cela, il trouva, en partant de la même végétation primitive, que s'il choisissait une tache de

levure provenant d'une cellule sporifère, et s'il continuait le développement de cette tache, il obtenait une végétation qui avait la faculté de reproduire immédiatement des spores en abondance. Par un pareil choix méthodique, cette espèce fut divisée en trois formes végétatives dont l'une se distinguait par une sporulation vigoureuse, tandis que l'autre avait presque complètement perdu cette propriété, et que la troisième ne formait plus du tout de spores. *Après de nombreuses cultures dans du moût, la troisième forme retrouva cependant sa sporulation, quoique lentement ; mais en la cultivant dans une solution de dextrose avec de l'eau de levure, cette propriété réapparaissait immédiatement.*

Chez d'autres espèces, il peut également se présenter des variétés ayant perdu complètement ou en partie la faculté de produire des spores, que ce soit dans des milieux liquides ou solides, sans que la cause en soit connue. Dans quelques cas, elles retrouvent leur sporulation, comme le *Saccharomyces Ludwigii*, quand on ajoute de la dextrose au liquide nourricier.

Lorsque la culture d'une levure de brasserie est développée dans un *moût non aéré* après stérilisation, elle perd ordinairement, plus ou moins, selon l'espèce, ses qualités quant à la *cassure* et à la *clarification* demandées en brasserie. Ces nouvelles variations doivent souvent être cultivées pendant de nombreuses générations dans du moût de bière ordinaire, avant de regagner les qualités primitives de l'espèce. L'aération ayant son importance quant à la composition chimique du moût, il est évident que ce sont des conditions de ce genre qui exercent l'influence indiquée sur le plasma de la cellule.

Un autre exemple, démontrant que la composition chimique du liquide peut produire de nouvelles variétés, ressort de l'observation, que le *Saccharomyces pastorianus* I, qui donne au moût de bière un goût et une odeur désa-

gréables, peut perdre pour quelque temps, cette propriété, si on conserve la végétation dans une *solution aqueuse de sucre de canne*.

Seiffert a indiqué un cas analogue de variation d'une levure de brasserie due à la composition du liquide nourricier. Il trouva qu'il était possible, par l'emploi de *chaux*, de ramener à son état primitif, une bonne race de levure choisie, qui, après avoir été longtemps employée en pratique, avait perdu ses bonnes qualités de clarification et de cassure. On ajouta du plâtre au moût, à l'eau de brassage ou à celle de trempe de l'orge et prépara avec le moût ainsi obtenu un moût gélatiné, dans lequel la végétation de levure dégénérée futensemencée par une nouvelle culture pure. Les nouvelles végétations provenant du développement des colonies dans les petits ballons avaient une cassure ainsi que la faculté de former un dépôt compact au fond du ballon, et les qualités reconquises se firent valoir dans l'emploi pratique de cette levure.

Un autre exemple de transformation physiologique est le suivant. Les trois espèces du groupe *Saccharomyces pastorianus* décrites par Hansen ferment, dans certains cas, un *dépôt pâteux* semblable à celui des autres *Saccharomyces*, dans d'autres cas au contraire, un *dépôt semblable à une membrane froncée*, où un *dépôt caséux* se composant de petits grumeaux (levure caséuse de Pasteur), c'est-à-dire qu'elles ferment des dépôts d'aspect très différent tout en étant cependant constitués par les mêmes espèces. Dans le dernier cas, le moût en fermentation prend aussi un aspect tout particulier parce que, contrairement à ce qui a lieu à l'ordinaire, la fermentation reste continuellement limpide. On peut donc parfaitement voir les flocons de levure s'élever du fond vers la surface et redescendre ensuite. Après de nouvelles fermentations ininterrompues dans du moût, on peut transformer ce dépôt particulier en un dépôt pâteux.

Enfin, nous trouvons aussi une transformation physiologique passagère analogue dans les *formations de voiles des Saccharomyces*.

4. — Au commencement de l'année 1889, Hansen (1) publia une série d'expériences ayant pour but de découvrir les conditions de la variation, et d'obtenir par voie expérimentale de nouvelles races et si possible de nouvelles espèces. Plus tard, ce savant a publié de nouvelles recherches dans ce même ordre d'idées.

(a) Il trouva, pour les espèces typiques de *Saccharomyces*, que lorsque leurs cellules étaient cultivées pendant assez longtemps dans du moût oxygéné, à une température supérieure au maximum de celle de la sporulation et voisine de la température maxima pour le développement végétatif, elles étaient influencées à tel point qu'elles perdaient leur puissance de former des spores et des voiles, et cela était toujours le cas pour les nombreuses générations développées peu à peu dans de nouvelles cultures, sous les conditions les plus variées.

Hansen réussit aussi à produire ces transformations par culture sur un milieu solide.

On observa aussi, chez quelques espèces traitées ainsi, qu'en culture dans du moût, elles donnaient une récolte de levure plus abondante, mais une fermentation plus longue. Ceci fut par exemple le cas avec la levure basse de Carlsberg n° 2. Cette variété, nouvellement formée, atténuait plus lentement et moins que l'espèce primitive, mais elle donnait une meilleure clarification.

Raymann et Kruis ont démontré que les cellules des voiles ont le pouvoir d'oxyder l'alcool produit par la fer-

(1) *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*. Vol. V. page 665, 1889.

mentation, en acide carbonique et en eau. Les variétés de *Hansen* ayant complètement abandonné la formation de voiles, ont perdu en même temps ce pouvoir oxydant. Tandis qu'un ballon renfermant la forme primitive qui avait développé un fort voile, ne contenait plus que 11/2 0/0 d'alcool en volume, après un repos de six mois, le ballon parallèle, qui n'avait pas formé de voile, montra encore après le même laps de temps, 5,5 0/0 d'alcool en volume, c'est-à-dire la même quantité que *Hansen* y avait constatée dès les premiers mois.

Dans une autre série d'essais, *Hansen* démontra que l'action de températures élevées sur les cellules, mais sans aération, pouvait amener d'autres changements profonds et durables dans la nature du plasma. Après avoir cultivé la levure de Carlsberg n° 1 durant huit générations dans du moût à 32°, en ensemençant chaque nouvelle culture avec de la levure provenant de celle qui précédait, qu'on laissait en repos pendant toute la durée de la fermentation, on a découvert dans la neuvième culture une variété qui, dans du moût de 14° Balling additionné de 10% de saccharose, produisait 1 à 2 0/0 d'alcool de moins que la forme primaire. La nouvelle variété donna dans la brasserie une clarification plus rapide et une plus faible atténuation à la fin de la fermentation principale. Pour d'autres espèces, on a observé les mêmes conditions.

(b) Des cultures sur gélatine permirent au même auteur de produire de nouvelles variétés ou espèces constantes.

Ainsi deux variétés de la levure de Carlsberg n° 1 acquirent un pouvoir fermentatif plus élevé que celui des formes primitives, par des cultures répétées des nouvelles générations à la surface du moût gélatiné.

La différence parut encore plus sensible, lorsque des cultures développées des spores de la levure haute *Sac-*

charomyces cerevisiæ I eurent été propagées sur de l'eau de levure gélatinée. Les nouvelles variétés fournirent jusque 3 0/0 d'alcool de plus que la forme primaire.

L'auteur de ce livre a fait, depuis plusieurs années, de nombreuses expériences sur la *variation des levures basses et hautes de brasserie* pendant leur emploi industriel. On a constaté qu'il pouvait se produire une *dégénérescence de la masse de levure*, provoquée par le fait qu'un grand nombre d'individus de la végétation avaient admis des propriétés autres que celles désirées en pratique. Dans ce cas, la race de levure peut être ramenée à son état primitif par le choix d'individus « non dégénérés » effectué dans la levure employée en brasserie, en isolant un grand nombre de cellules dont on développe des cultures absolument pures, pour s'arrêter à celle qui possède les qualités exigées dans la pratique.

La variation de la masse de levure, observée dans la pratique, a de plus, été mise à profit par l'auteur, en vue d'obtenir une amélioration successive du levain de brasserie, en prélevant de fermentations particulièrement bonnes, des échantillons dont on isolait des séries de cellules. Parmi les végétations qui en étaient nées, on choisit alors celles qui possèdent à haut degré les propriétés requises. Un travail méthodique poursuivi depuis plusieurs années dans cet ordre d'idées a mené à des résultats très favorables.

En examinant les cellules des générations successives dans les transformations des spores que nous venons de décrire au point de vue de l'influence de la température et de l'aération, les recherches de *Hansen* nous apprennent qu'un grand nombre de cellules sont transformées dès les premières végétations développées dans ces nouvelles conditions; mais ces transformations ne sont que passagères. Ce n'est qu'après le développement des géné-

rations suivantes, par un ensemencement continu, effectué dans les nouvelles conditions, que les caractères deviennent constants. Il résulte de ce fait que cette transformation ne dépend pas uniquement de la *température* et de l'*aération*, mais encore de la *nutrition* et de la *multiplication* des cellules.

La comparaison de ces divers facteurs a toutefois montré que leur valeur varie beaucoup. Le liquide nourricier autant que l'aération n'ont d'importance qu'en tant qu'ils doivent provoquer de vigoureuses formations nouvelles et ils peuvent, par conséquent, sensiblement varier, sans que le résultat en soit grandement influencé. Mais ceci ne s'applique pas à la température; une différence de quelques degrés suffit pour pouvoir empêcher la naissance des variations indiquées. Il résulte de ceci que la *température* joue le rôle principal dans les transformations mentionnées.

On ne saurait rien objecter contre la supposition qu'on se trouve peut-être, ici, en présence de la formation de nouvelles espèces. Nous savons que l'espèce n'est pas une chose invariable et fixe, comme on l'admettait généralement du temps de Linné, mais que les caractères des espèces ne sont constants que dans de certaines conditions. L'éclaircissement complet de ce problème ardu et important nécessitera des essais nombreux et variés, poursuivis pendant longtemps.

Comme nous l'avons dit plus haut, ces transformations remarquables décrites n'ont été provoquées *que par une action puissante et assez longtemps prolongée sur les fonctions vitales de ces cellules*; ces transformations ne se présentent pas tant que le développement a lieu d'une façon normale.

Nous avons, dans les brasseries et distilleries, un exemple de l'énergie avec laquelle la cellule des *Saccharomyces* conserve, dans des conditions *normales*, sa puissance de

sporulation. Ici les espèces de levures de culture ont continué à vivre pendant des siècles, et elles ont développé d'innombrables générations dans des conditions qui n'ont pas permis l'entrée en jeu des fonctions mentionnées, et cependant elles ont toujours conservé opiniâtement cette propriété.

h. — Formation mucilagineuse des levures.

Dans de certaines conditions qui ne sont encore qu'insuffisamment connues, les colonies produites par le bourgeonnement des cellules de levure peuvent se réunir en amas irréguliers, qui tombent plus vite au fond que les cellules de levure isolées (cassure et clarification dans les brasseries). Ceci est assurément en relation avec un côté du développement de la cellule de levure que Hansen découvrit en 1884. Il observa que les *Saccharomyces* aussi bien que d'autres champignons bourgeonnants peuvent sécréter un *réseau gélatineux*, qui, en le préparant, se présente sous forme de cordes ou de lames dans lesquelles sont logées les cellules (Fig. 46 A. B.) Si l'on porte, par exemple, un peu de levure de brasserie dans un bocal qu'on recouvre et qu'on laisse en repos de manière à ce qu'elle

se dessèche lentement, une trace de cette levure diluée dans une goutte d'eau montrera distinctement ce réseau (Fig. 46 A). Cette formation ap-

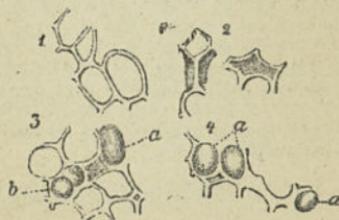


FIG. 46. — A.

paraît également dans les cultures sur des blocs de plâtre

et sur gélatine. Après que Hansen nous y eut rendu atten-

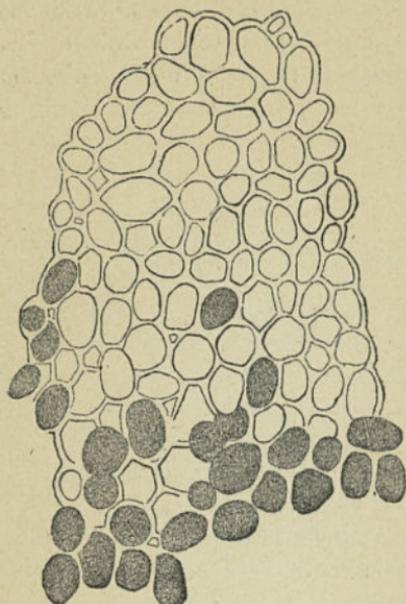


FIG. 46. — B.

Cellules de levure avec formation du réseau gélatineux d'après Hansen. 46 A Le réseau a été obtenu par un dessèchement partiel. 1 Partie formée par des cordes dont les cellules sont tombées ; 2 et 3 montrent que le réseau peut en même temps affecter la forme de parois entières ; une telle formation se trouve entre a et b ; a est une cellule végétative, b une cellule avec deux spores ; dans 4 on voit près de a trois cellules logées dans le réseau. 46 B Formation de réseau et cellules de levure. Ces dernières ont été colorées avec du violet de méthyle. Le réseau est incolore. Quelques cellules se trouvent encore dans les mailles ; la plupart sont déplacées.

plus à faire paraître le réseau par des

tif, nous avons nous-même observé fréquemment cette remarquable formation dans des échantillons de levure, qui avaient été expédiés à notre laboratoire sous enveloppe dans du papier à filtrer (1). Hansen l'observa également dans les formations de voiles de la plupart des espèces. Un simple examen microscopique du levain de brasserie ne détecte pas cette formation ; avec l'aide des colorations, elle apparaît cependant nettement (Fig. 46 B). En lavant à plusieurs reprises la levure, on n'arrivait non colorations ; mais

(1) Ce procédé permettant de conserver la levure pendant quelque temps, est très commode. On passe rapidement quel-

en éloignant l'eau et en laissant reposer les cellules pendant quelque temps, une préparation convenable put facilement faire réapparaître la masse mucilagineuse. En variant les conditions d'alimentation des cellules, le développement put être activé ou arrêté, et la composition chimique put être changée. Tout cela nous rappelle la formation des zoogloées chez les bactéries.

Structure et constitution de la cellule de levure.

Vue au microscope, une cellule de levure, telle qu'elle se trouve le plus souvent dans un liquide en fermentation, apparaît ordinairement comme un corps sphérique ou ovale qui se renfle et s'étrangle pour produire un ou plusieurs bourgeons, qui peuvent tôt ou tard se séparer de la cellule mère. La membrane de la cellule peut, dans les différentes phases de développement, se former quelque peu différemment, mais rarement d'une façon marquante. Le contenu de cette cellule se comporte par contre tout autrement. Pour s'en faire une idée nette, il faut observer la cellule dans sa période de croissance la plus énergique : le contenu consiste alors en un plasma hyalin et homogène. A mesure que l'activité végétative et fermentative augmente, plusieurs corpuscules de différente nature apparaissent dans ce plasma : des parties transparentes remplies de liquide (vacuoles) ou des grains plus ou moins grands, dont quelques-uns peuvent être considérés comme des globules de graisse, tandis que d'autres paraissent être plutôt de la nature du plasma. Ces corps (granules)

quefois par la flamme une petite feuille de papier à filtrer sur laquelle on verse quelques gouttes de levure, puis on la plie et on la place ensuite entre plusieurs feuilles du même papier préparées de la même manière.

ont été décrits en détail par *Raum* et *Eisenschitz*. Cette consistance granuleuse du plasma s'accroît avec le développement, et dans une période plus avancée de la fermentation, lorsque la cellule est arrivée presque à l'état de repos, le plasma peut se réduire en une fine couche tapissant les parois intérieures de la cellule. Le centre de cette dernière se remplit alors d'une grosse vacuole contenant de nombreux grains petits et grands, dont la plupart sont gras. Si l'on introduit de nouveau de semblables cellules dans un liquide fermentescible, elles montreront bientôt un aspect extrêmement caractéristique pendant la période qui précède les phénomènes de la fermentation pouvant être distingués à l'œil nu. Les granulations disparaissent et de nombreux filaments plasmatiques font leur apparition dans le liquide transparent des cellules, où ils circonscrivent peu à peu des vacuoles arrondies; finalement, celles-ci disparaissent et la cellule se trouve de nouveau remplie d'un plasma limpide et homogène.

Lorsque la levure est cultivée à 30° C. dans du moût de bière additionnée de 10 0/0 de sucre de cannes, ou bien dans de l'eau de navets, ou dans de certains liquides nourriciers de composition artificielle, le plasma des cellules est coloré en brun violet avec de l'iode; cette teinte disparaît par le chauffage, mais réapparaît à de basses températures. On a expliqué cette réaction comme étant la preuve de la présence de *glycogène*, une substance de réserve (hydrate de carbone), qui se présente chez les animaux et probablement aussi chez divers champignons où il joue le même rôle que l'amidon dans les plantes vertes.

Comme c'est le cas, dans la plupart des cellules des plantes, on a aussi trouvé dans la cellule de levure un *noyau cellulaire* (Schmitz le découvrit le premier) que l'on peut rendre apparent en colorant avec de l'acide osmique ou de l'acide picrique et de l'hématoxyline. Sui-

vant Hansen, ce noyau cellulaire est sphérique ou discoïde. Il trouva par exemple dans les vieilles formations de voiles des cellules de *Saccharomyces* qui, sans aucune préparation, montrèrent distinctement le noyau cellulaire.

Janssens et Dangeand constatèrent la scission du noyau cellulaire pendant le bourgeonnement, ce dernier auteur et Buscalioni aussi pendant la sporulation des *Saccharomyces*.

CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE DES SACCHAROMYCES.

La plupart des *Saccharomyces* ne sont connus que comme *champignons bourgeonnants* avec formation de *spores endogènes*. Chez un petit nombre d'entre eux on connaît aussi un stade de moisissure, ayant de l'analogie avec le *Dematium*, l'*Oidium* ou la *Monilia* (1).

Un groupe spécial ne présente la multiplication végétative que par *division* sous *formation de cloisons transversales*.

Chez la plupart des espèces, les *spores* germantes développent des *cellules bourgeonnantes*; chez quelques autres, la spore donne naissance à un *fil germinatif*.

Dans la même espèce, les cellules des *Saccharomyces* se présentent avec des formes différentes.

Dans les cellules se produisent des noyaux cellulaires, qui ne peuvent ordinairement être observés qu'après un traitement spécial.

Les cellules secrètent un réseau gélatineux, qui peut

(1) Des données *expérimentales* prouvant que les *Saccharomyces* tirent leur origine d'autres espèces de champignons n'ont pas encore été fournies.

se développer très fortement dans des conditions favorables.

Brefeld a démontré qu'un grand nombre d'Ustilaginées (microbes du charbon), de Basidiomycètes et d'autres champignons, peuvent entrer dans une phase de bourgeonnement. Des faits analogues avaient été observés précédemment par *Bail*, de *Bary*, *Reess*, *Zopf*, et d'autres. *Brefeld* n'ayant pas prouvé si ces formes possèdent la qualité propre aux Saccharomyces, de former des spores endogènes, ni si elles étaient capables de produire une activité fermentative prononcée, ses assertions qu'elles étaient équivalentes aux Saccharomycètes, perdirent tout fondement.

La plupart des espèces provoquent une fermentation alcoolique.

Comme il a été dit précédemment, les noms de *Saccharomyces cerevisiæ*, *ellipsoïdeus* et *Pastorianus*, etc., adoptés par *Reess*, sont employés aujourd'hui dans un tout autre sens que ne leur avait attribué ce savant. Les travaux de *Hansen* ont établi que les caractères distinctifs des espèces ne peuvent être tirés de la forme et de la grosseur des cellules, comme *Reess* le croyait. Une espèce qui se présenterait, dans de certaines conditions, sous des formes correspondant, d'après *Reess*, à la description du *Saccharomyces cerevisiæ*, c'est-à-dire avec de grosses cellules rondes et allongées, peut, dans d'autres conditions de croissance, développer une végétation qui, suivant *Reess*, serait à décrire comme *Saccharomyces ellipsoïdeus*, et inversement ; les mêmes espèces qui, dans certaines conditions, seraient à désigner comme *Saccharomyces cerevisiæ* ou *Saccharomyces ellipsoïdeus* devront, dans d'autres cas, être considérées comme *Saccharomyces Pastorianus*. La forme et la grosseur des cellules ne peuvent donc servir comme caractère spécifique que lorsqu'en même temps sont indiquées les conditions de culture sous lesquelles la végéta-

tion s'est développée. Mais, comme il existe un grand nombre d'espèces qui, dans les mêmes conditions de croissance, seraient à décrire d'après la forme des cellules comme *Saccharomyces ellipsoïdeus*, *Saccharomyces cerevisiæ*, etc., les noms adoptés par *Reess* dans la signification qu'ils ont ici, doivent, par conséquent, désigner des *groupes d'espèces*; ces espèces se différencient à leur tour par une série de caractères particuliers. Les descriptions systématiques suivantes se basent essentiellement sur les résultats des recherches expérimentales de *Hansen*. D'après cet auteur, il y aurait plusieurs raisons permettant d'admettre que la forme ovale des cellules de levure est la forme primitive dont les différentes végétations pastoriennes plus ou moins prononcées se seraient développées.

***Saccharomyces cerevisiæ* I. — Hansen (1)**

(Fig. 47, 49).

Cette espèce et les cinq suivantes (*Saccharomyces Pastorianus* I, II et III et *Saccharomyces ellipsoïdeus* I et II) produisent toutes de l'invertine et de la maltase; elles transforment ainsi la saccharose ou la maltose en sucre interverti qu'elles font ensuite fermenter. Toutes font fermenter énergiquement la dextrose, ainsi que des solutions de maltose, surtout quand on y ajoute un peu de liquide nourricier, par exemple de l'eau de levure. Elles sont toutes de forts ferments alcooliques qui, cultivés dans du

(1) Cette levure de fermentation haute ne doit pas être confondue avec la levure basse Carlsberg n° 1 de Hansen.

mout de bière, à la température de la chambre, produisent dans l'espace de quinze jours facilement de 4 à 6 0/0 d'alcool en volume. Dans la lactose, elles ne peuvent produire aucune fermentation.

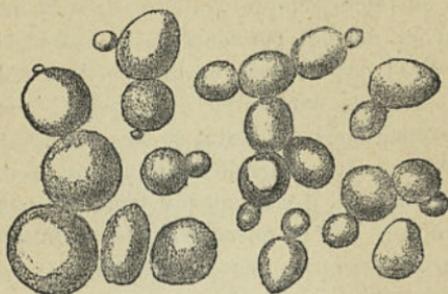


FIG. 47.

Saccharomyces cerevisiae I. Hansen.
Formes cellulaires de la jeune levure déposée,
d'après Hansen.

Le *Saccharomyces cerevisiae* I est une vieille levure haute anglaise, qui s'emploie dans les brasseries de Londres et d'Edimbourg.

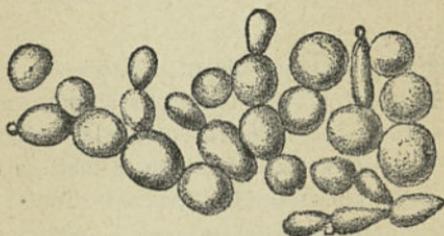


FIG. 48.

Saccharomyces cerevisiae I. Hansen.
Formes de voiles à 15 — 6° (C.,) d'après Hansen.

La jeune végétation de levure de dépôt (Fig. 47) développée dans du mout de bière, consiste principalement en grandes cellules rondes ou ovales ; des cellules allon-

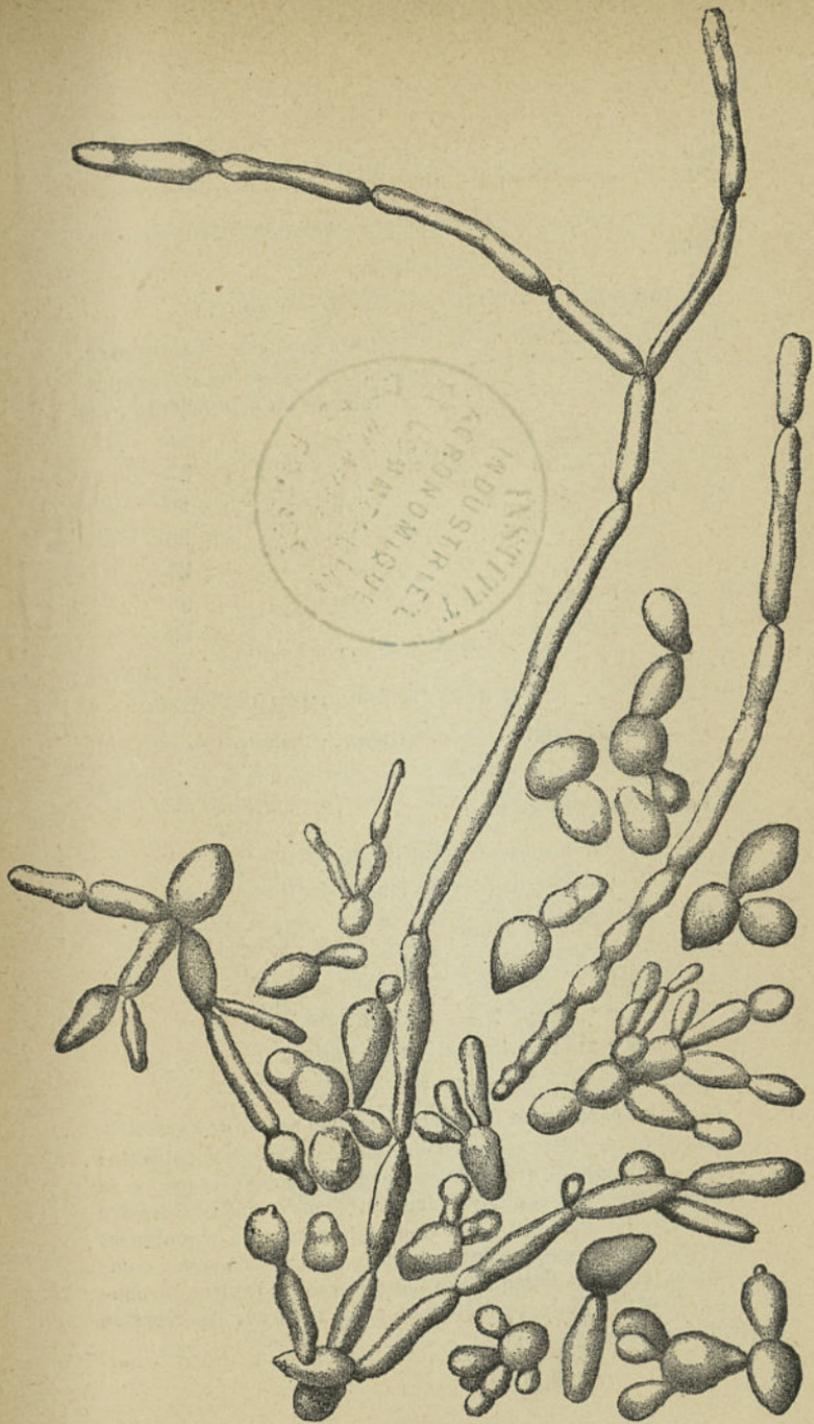


FIG. 49.

Saccharomyces cerevisiae I. Hansen

Formes cellulaires dans de vieilles cultures de voiles, d'après Hansen.

gées proprement dites ne se présentent pas dans ces conditions.

Formation des ascospores (Fig. 37-39, 43). (1)

A	37 1/2° C.	il ne se développe pas d'ascospores.
» 36 — 37	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de 29 heures
» — 35	»	» 25 »
» — 33 1/2	»	» 23 »
» — 30	»	» 20 »
» — 25	»	» 23 »
» — 23	»	» 27 »
» — 17 1/2	»	» 30 »
» — 16 1/2	»	» 63 »
» 11 — 12	»	» 10 jours
» — 9	»	il ne se développe pas d'ascospores.

Les spores sont très réfringentes. Leurs parois sont très distinctes. La grandeur des spores est de 2 1/2 à 6 μ .

Formation des voiles :

A	38° C.	aucune formation de voile.
» 33 — 34	» au bout de 9 — 18 jours	taches faiblement développées
» 26 — 28	» 7 — 11 »	» »
» 20 — 22	» 7 — 10 »	» »
» 13 — 15	» 15 — 30 »	} (fig. 48) »
» 6 — 7	» 2 — 3 mois	
» 5	» aucune formation de voile.	

(1) La préparation de la végétation d'une espèce de *Saccharomyces* pour de telles recherches se fait de la manière suivante : après avoir cultivé les cellules pendant quelque temps à la température de la chambre, dans du moût de bière ordinaire (d'environ 14° Balling), on introduit de jeunes et vigoureuses cellules de cette culture dans un nouveau moût de même composition, et on les laisse se développer pendant environ 24 heures à 25-27° C. Cette végétation se place alors sur des blocs de plâtre.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-34° C. : Colonies fréquentes ; apparition de cellules allongées et d'aspect bizarre.

A 15-6° C. (Fig. 48) : La majeure partie des cellules ont pris la forme de celles qui avaient servi à l'ensemencement ; des cellules isolées offrent des formes irrégulières.

Dans de vieilles cultures de voiles, toutes les formes cellulaires se présentent, jusqu'aux formes extrêmement allongées ayant l'apparence d'un mycélium (Fig. 49).

Saccharomyces Pastorianus I. Hansen.

(Fig. 50, 51)

Levure basse.

Formes de dépôt cultivées dans du moût : Les cellules

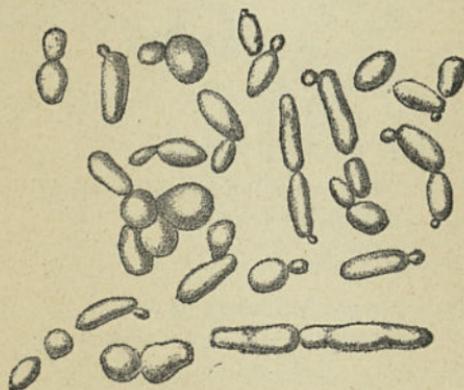


FIG. 50.

Saccharomyces Pastorianus I, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

allongées prédominent ; il se trouve aussi dans cette le-

vure de grandes et de petites cellules rondes ou ovales (Fig. 50).

On le rencontre fréquemment dans l'air des locaux où a lieu la fermentation. Communique à la bière *un goût amer désagréable et une mauvaise odeur*, peut aussi amener un trouble de levure et entraver la clarification en cuve.

D'après les recherches de *Mach* et de *Portele*, cette espèce peut néanmoins être employée avec succès dans la fermentation vinaire.

Formation des ascospores (Fig. 43,²):

A	31 1/2° C.	aucune formation d'ascospores.
»	29 1/2 — 30 1/2	» les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de 30 heures
»	29	» 27 »
»	27 1/2	» 24 »
»	23 1/2	» 26 »
»	18	» 35 »
»	15	» 50 »
»	10	» 89 »
»	8 1/2	» 5 jours
»	7	» 7 »
»	3 — 4	» 14 »
»	1/2	» aucune formation de spores.

Grandeur des spores 1 1/2-5 μ .

Formation des voiles :

A	34° C.	aucune formation de voile.
»	26 — 28	» au bout de 7 — 10 jours, taches faiblement développées
»	20 — 22	» 8 — 15 » » »
»	13 — 15	» 15 — 30 » } (fig. 51) »
»	6 — 7	» 1 — 2 mois } (fig. 51) »
»	3 — 5	» 5 — 6 » } comme la fig. 51, mais sans les grandes colonies.
»	2 — 3	» aucune formation de voile.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. : A peu près les mêmes formes que dans la levure déposée.

A 13-15° C. : Vigoureuses colonies ayant l'apparence d'un mycélium à cellules ordinairement très allongées ;

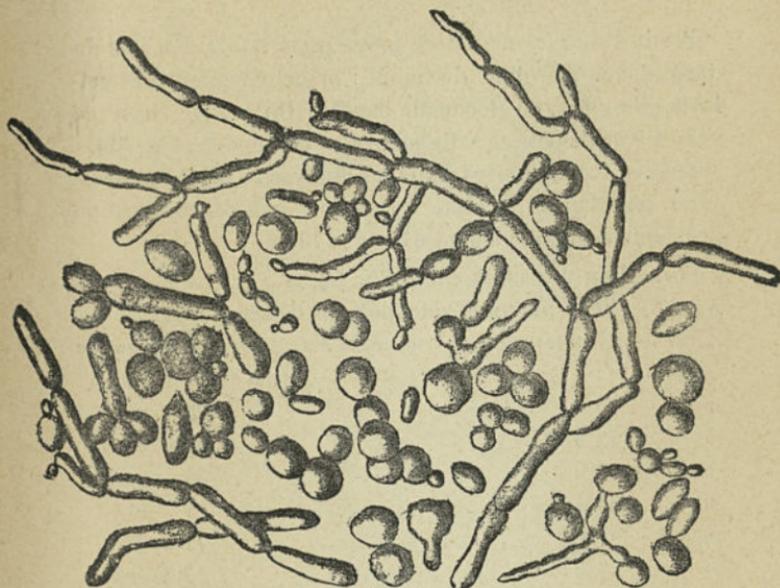


FIG. 51.

Saccharomyces Pastorianus I, Hansen.

Végétations de voiles à 13-15° C., d'après les dessins de Holm dans le mémoire de Hansen.

des cellules en forme de boudin assez fréquentes (Fig. 51).

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules sont plus petites que dans le dépôt ; on trouve des cellules très bizarres, quelquefois presque filiformes.

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen.

(Fig. 52, 53).

Produit une fermentation haute mais faible. Formes du dépôt développé dans du moût : principalement des cellules allongées, en forme de boudin. On trouve aussi de grandes et de petites cellules ovales ou rondes (Fig. 52).

Trouvé fréquemment dans les analyses d'air de la brasserie, par Hansen, semble appartenir aux espèces qui ne provoquent aucune maladie dans la bière.

Formation des ascospores (Fig. 43,³).

A	29° C.	aucun développement d'ascospores.
»	27 — 28°	» les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de 34 heures
»	25 »	» 25 »
»	23 »	» 27 »
»	17 »	» 36 »
»	51 »	» 48 »
»	11 1/2	» 77 »
»	7 »	» 7 jours
»	3 — 4 »	» 17 »
»	1/2	aucun développement de spores.

Grandeur des spores 2-5 μ .

Formation des voiles :

A	34° C.	aucune formation de voile.
»	26 — 28 »	» au bout de 7 — 10 jours taches faiblement développées
»	20 — 22 »	8 — 15 » »
»	13 — 15 »	10 — 25 » »
»	6 — 7 »	1 — 2 mois } (fig. 53). »
»	3 — 5 »	5 — 6 » »
»	2 — 3 »	aucune formation de voile.



FIG. 52.

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen

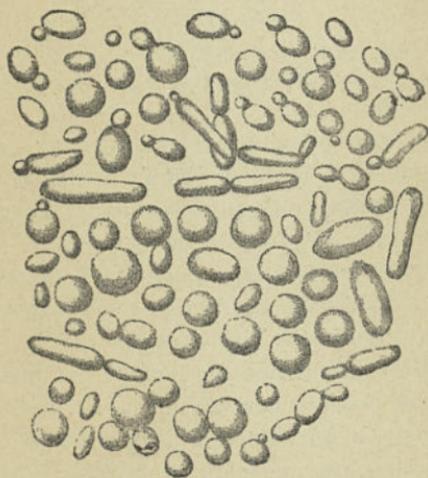


FIG. 53.

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen.

Végétations de voiles à 15-3° C., d'après les dessins de Holm, dans le mémoire de Hansen.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. Presque les mêmes formes que dans le dépôt ; en outre, des cellules bizarres en forme de boudin.

A 15-3° C. : Prédominance des cellules ovales et rondes.

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules sont plus petites que dans la levure déposée ; il s'y trouve des cellules très bizarres, quelquefois presque filiformes.

Dans de l'eau de levure gélatinée, des cultures en stries de cette espèce donnent, à 15° C., au bout de 16 jours, des végétations avec des bords passablement unis, ce qui la différencie aussi de l'autre espèce.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.

(Fig. 54, 55).

Levure haute.

Forme du dépôt développé dans du moût : cellules en général allongées, en forme de boudin, accompagnées d'autres cellules grandes ou petites, ovales ou rondes (Fig. 54).

A été extrait de bière de fermentation basse troublée par la levure et désigné par Hansen comme *formant une des espèces qui rendent la bière trouble*.

De nouvelles expériences de Hansen ont montré que cette levure de maladie possède une autre particularité : quand le moût en fermentation devient opalin, on peut, dans certains cas, par une addition de *Sacch. Pastorianus III*, déterminer une clarification.

D'après les recherches de l'auteur de ce livre, une levure basse, fortement infectée avec cette espèce, peut, dans

certains cas, provoquer une clarification particulièrement bonne et une belle cassure en cuve et dans les foudres.

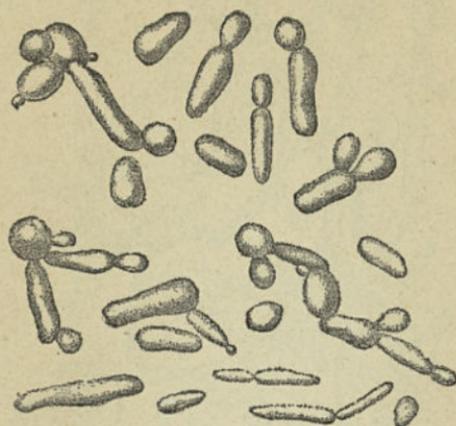


FIG. 54.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

Formation des ascospores (Fig. 43').

A	29° C.	aucun développement d'ascospores.	
»	27	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de 35 heures.
»	26 1/2	»	30 »
»	25 »	»	28 »
»	22 »	»	29 »
»	17 »	»	44 »
»	16 »	»	53 »
»	10 1/2	»	7 jours.
»	8 1/2	»	9 »
»	4	aucun développement de spores.	

Grandeur des spores 2-5 μ .

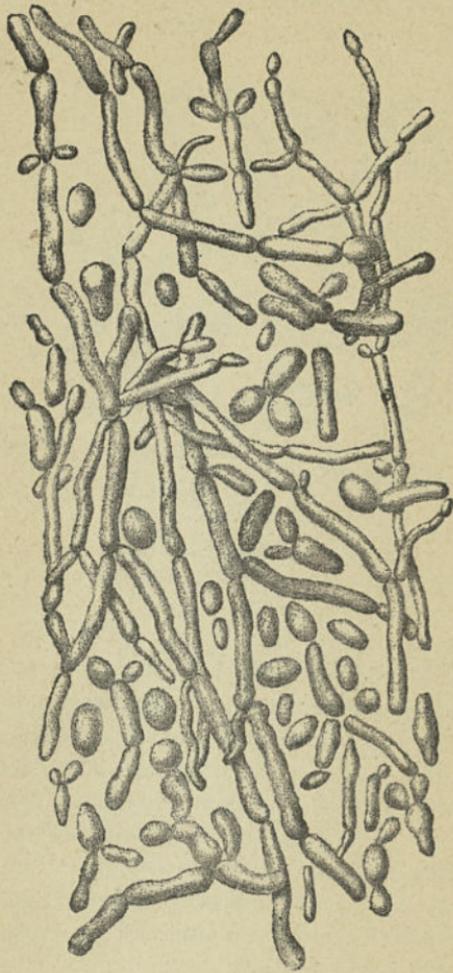


FIG. 55.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.
Végétations de voiles à 15-3° C., d'après Hansen.

Formation des voiles :

- A 34° C. aucune formation de voile.
- | | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------------|
| » 26 — 28 » | au bout de 7 — 10 jours | tachés faiblement développés. |
| » 20 — 22 » | 9 — 12 | » » |
| » 13 — 15 » | 10 — 20 | » » |
| » 6 — 7 » | 1 — 2 mois | } (fig. 55). » |
| » 3 — 5 » | 5 — 6 | |
- » 2 — 3 » aucune formation de voile.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. : Presque les mêmes formes que dans le dépôt.

A 15-3° C. : Colonies fortement développées de cellules allongées, en forme de boudin ou filiformes, dont l'aspect se rapproche beaucoup d'un mycélium (Fig. 55).

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules ont les mêmes formes qu'à 15-3° C. souvent même elles sont plus minces et plus effilées.

Dans de l'eau de levure gélatinée, des cultures en stries de cette espèce donnent à 15° C., au bout de 16 jours, des végétations aux bords poilus très accusés (1).

(1) Au groupe pastorien appartient encore la levure *Logos*, décrite par *van Laer*, une levure basse originaire du Brésil, à clarification très rapide, dont les cellules se réunissent pendant la fermentation en paquets volumineux, ramifiés qui se déposent au fond et aux parois des cuves à fermenter. La levure *Logos* a une fermentation très lente, mais produit peu à peu des taux élevés d'alcool. Des recherches de *Rothenbach* ont démontré que cette espèce est capable de faire fermenter environ la moitié d'une diastase-dextrine préparée suivant les indications de *Lintner*, mais, faisant fermenter d'autres espèces de dextrine, elle se distingue par là du *Sacch. Pombé*, décrit plus bas.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen.

Fig. 56, 57)

Levure basse.

Formes de la levure déposée développée dans du moût :
cellules en général ovales ou rondes ; les cellules allon-
gées sont rares (Fig. 56).

Se trouve à la surface des *raisins mûrs*.Formation des ascospores (Fig. 43^b).

A	32 1/2° C.	aucun développement d'ascospores.
»	30 1/2 — 31 1/2	» les premiers rudiments des spores appa- raissent au bout de 36 heures
»	29 1/2	» 23 »
»	25	» 21 »
»	18	» 33 »
»	15	» 45 »
»	10 1/2	» 4 1/2 jours
»	7 1/2	» 11 »
»	4	» aucun développement de spores.

Grandeur des spores 2-4 μ

Formation des voiles :

A	38° C.	aucune formation de voile.
»	33 — 34	» au bout de 8 — 12 jours taches faiblement développées.
»	26 — 28	» 9 — 16 » »
»	20 — 22	» 10 — 17 » »
»	13 — 15	» 15 — 30 (Fig. 57) » »
»	6 — 7	» 2 — 3 mois » »
»	5	» aucune formation de voile.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-34° C. et à 6-7° C., cellules plus petites, celles en

forme de boudin y abondent plus que dans la levure du dépôt.

A 13-15° C., colonies abondamment ramifiées et forte-



FIG. 56.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

ment développées de cellules en forme de boudin, courtes ou allongées, souvent avec des branches verticillées (Fig. 57).

Dans de *vieilles cultures de voiles*, on trouve les mêmes formes cellulaires qu'à 13-15° C.

Dans du *moût gélatiné* (moût de bière avec addition de 3 1/2 % de gélatine), la culture en stries de cette espèce à 25° C. a, par opposition aux cinq autres espèces qui ont été décrites en détail, une *structure particulière en forme de réseau*, ce qui permet de la reconnaître à l'œil nu.

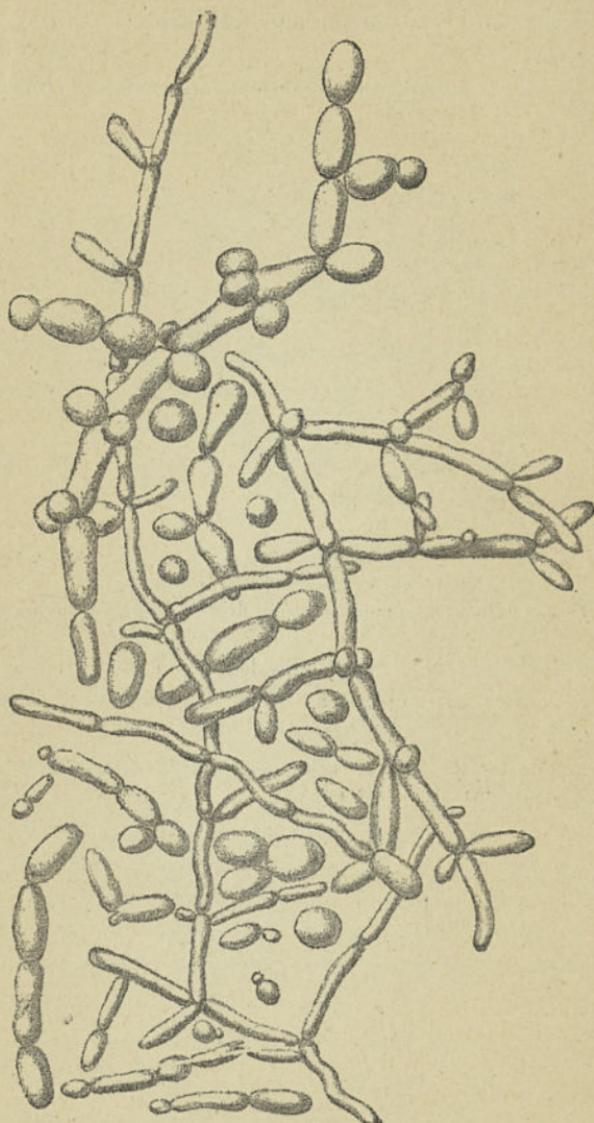


FIG. 57.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen.
Végétations de voiles à 13-15° C., d'après les dessins de Holm, dans le
mémoire de Hansen.

Saccharomyces ellipsoideus II, Hansen.

(Fig. 58, 59)

Provoque ordinairement une fermentation basse.

Formes du dépôt développées dans du moût: les cellules ovales et rondes prédominent; les cellules allongées sont (Fig. 58).



FIG. 58.

Saccharomyces ellipsoideus II, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

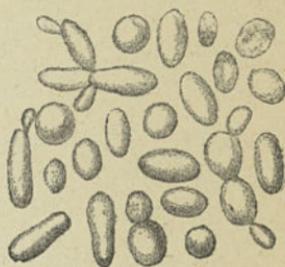


FIG. 59.

Végétation de voiles à 28-3° C., d'après Hansen.

A été trouvée dans des bières troublées par la levure. C'est une espèce qui trouble la bière, et qui, pour la fermentation basse est encore plus dangereuse que le *Saccharomyces pastorianus III*.

Formation des ascospores (Fig. 43°):

A	33°	C.	aucun développement d'ascospores.	
»	33 — 34	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de 31 heures	
»	33	»	»	27 »
»	31 1/2	»	»	23 »
»	29	»	»	22 »
»	25	»	»	27 »
»	18	»	»	42 »
»	11	»	»	51/2 jours
»	8	»	»	9 »
»	4	»	aucun développement d'ascospores.	

Grandeur des spores 2-5 μ .

Formation des voiles :

A	40°	C.	aucune formation de voile.	
»	36 — 38	»	au bout de 8 — 12 jours taches faiblement développées.	
»	33 — 34	»	3 — 4	»
»	26 — 28	»	4 — 5	»
»	20 — 22	»	4 — 6	»
»	13 — 15	»	8 — 10	»
»	6 — 7	»	1 — 2 mois	»
»	3 — 5	»	5 — 6	»
»	2 — 3	»	aucune formation de voile.	

Aspect microscopique des cellules dans les voiles : à toutes les températures, les mêmes formes que dans la levure déposée, à 15° C. et aux températures inférieures, les cellules sont seulement un peu plus allongées (Fig. 59).

Dans de *vieilles cultures de voiles* : colonies de cellules courtes et longues tubuliformes, des rameaux verticillés se présentent souvent.

Il faut mentionner ici deux espèces ellipsoïdales, décrites par *Will*, qui se rapprochent de cette levure, et qui donnent également lieu à des maladies de la bière. La

première, qui est une levure basse, donne, dans du moût gélatiné, des colonies offrant l'aspect, dans la période de jeunesse, — tant à la surface qu'à l'intérieur — d'un réseau à grandes mailles; plus tard le milieu devient plus compacte, tandis que les contours se frangent irrégulièrement. On voit cependant quelquefois, dans les mêmes conditions, des colonies compactes avec des bords réguliers. La température maxima de la sporulation est 39° C.; à la température optima (34° C.) les premiers rudiments des spores apparaissent déjà au bout de 11 heures. La limite inférieure de la température pour la sporulation se trouve de 4-5° C. Dans du moût stérilisé, les cellules végétatives succombent au bout d'une demi-heure en élevant la température jusqu'à 70° C. Pour la formation des voiles, les limites sont 41° et 4° C. C'est principalement dans de vieux voiles qu'apparaissent des colonies aux ramifications très nombreuses consistant en cellules très allongées. Cette espèce donne à la bière un *arrière-goût rêche et amer*; elle occasionne en même temps un *trouble très prononcé*.

La *deuxième espèce* ellipsoïdale recueillie dans de la bière troublée par la levure, produit dans du moût gélatiné soit des colonies nettement dessinées, soit des colonies aux contours vagues. Les limites de la température pour la sporulation sont 32° et 0,5° C. l'optimum est à 24° C. La limite vitale des cellules végétatives se trouve dans le moût à 70° C. Dans de vieux voiles on rencontre des colonies bourgeonnantes très ramifiées. Sans compter le *trouble* que cette espèce occasionne dans la bière, elle lui donne encore un *goût douxereux, désagréablement aromatisé* et un *arrière-goût amer et astringent*. La levure déposée est toujours de couleur foncée.

Saccharomyces Illicis. Grönlund

Celui-ci a été trouvé sur les fruits de *Ilex aquifolium*; c'est une levure basse avec des cellules généralement sphériques. Les limites de la température de la sporulation sont 8° et 38° C. Les spores n'ont pas de vacuoles. Dans les voiles, on trouve des cellules faiblement allongées. Les cultures en stries sur de la gélatine ont l'aspect de farine, mais différent essentiellement entre elles. La végétation de cette espèce donne au moût dans les ballons, un goût amer et désagréable. Suivant Schjerner, cette espèce possède le ferment intervertissant et produit une fermentation alcoolique dans des solutions de saccharose, de dextrose et de maltose. Dans du moût de bière ordinaire, elle peut produire environ 2,8 0/0 d'alcool en volume.

Saccharomyces Aquifolii. Grönlund.

Ce *Saccharomyces* a été aussi trouvé sur les fruits de *Ilex aquifolium*. C'est une levure haute à grandes cellules rondes. Les limites de température pour la formation des spores se trouvent à 8° et à 31° C.; les spores ont des vacuoles. Dans les voiles on ne trouve que des cellules sphériques et ovoïdes. Les cultures en stries sur gélatine ont des aspects différents, quelques-unes sont brillantes, d'autres farineuses. Elle donne au moût dans le ballon un goût d'une douceur désagréable avec un arrière-goût amer.

Cette espèce intervertit la saccharose et provoque une fermentation alcoolique dans des solutions de saccharose, de dextrose et de maltose. Dans du moût de bière ordinaire, elle peut produire environ 3,7 0/0 d'alcool en volume.

Saccharomyces pyriformis. Marshall Ward.

Ce *Saccharomyces*, qui est le ferment de la bière de gingembre, a été décrit à la page 109.

Saccharomyces Vordermanni.

Ce *Saccharomyces* a été découvert à Java par *Went* et *Prinsen-Geertjigs* comme agent essentiel dans la fermentation de l'arack. Il se distingue par l'énergie de son action comme ferment alcoolique et fournit un distillat très fin, ce qui a provoqué son emploi en culture pure dans cette fabrication. Les cellules en sont ellipsoïdales et développent jusqu'à $\frac{1}{4}$ spores. Cette espèce fait fermenter la dextrose, la maltose, ainsi que la Saccharose et possède de l'invertine.

Saccharomyces Marxianus. Hansen.

Cette espèce trouvée par Marx sur des raisins et décrite par Hansen, produit dans du moût de bière de petites cellules ovales et ovoïdes, qui ressemblent surtout à

celles des *Saccharomyces exiguus* et *ellipsoideus*. Cependant il se forme rapidement des colonies de cellules allongées en forme de boudin, et lorsque la culture dans du moût reste suffisamment longtemps abandonnée à elle-même, il se forme de petits corpuscules ressemblant à des moisissures, qui flottent dans le liquide, ou qui se déposent au fond du récipient. Ces corpuscules sont composés de colonies ayant l'apparence d'un mycélium qui ressemble essentiellement à ceux des formations de voiles des six espèces décrites précédemment. Ici aussi, ces colonies sont formées de particules qui se détachent facilement à leurs points de jonction, où l'on voit des étranglements. Les ascospores sont réniformes, sphériques ou ovales. Après avoir cultivé cette espèce pendant 2 ou 3 mois dans du moût, dans des ballons à deux tubulures, on ne trouve que des traces de formations de voiles, avec seulement peu de cellules allongées ou ovales.

Ce *Saccharomyces* appartient aux espèces qui, dans certaines conditions de culture, forment un mycélium sur un milieu nourricier solide.

Dans du moût de bière, ce champignon ne produit, même après un repos prolongé, que 1 à 1,3 0/0 d'alcool en volume. Il ne fait pas fermenter la maltose; il intervertit des solutions de saccharose, et il produit des quantités assez fortes d'alcool dans des solutions nourricières de saccharose, et pareillement dans des solutions nutritives de dextrose.

La température maxima de sporulation est située entre 32° et 34° C., la température minima entre 4° et 8° C., l'optimum se trouve entre 22° et 23° C. La végétation produit une sporulation plus abondante et plus rapide, lorsqu'elle est cultivée dans de l'eau de levure ou dans du moût avec 10 0/0 de dextrose (Klocker).

D'accord avec sa théorie que, avant d'être fermentée, la maltose est dédoublée par un enzyme spécial, différent de

l'invertine, *Emile Fischer* a observé qu'un extrait aqueux de la végétation pulvérisée de cette levure réduit la saccharose, mais non pas la maltose.

***Saccharomyces exiguus* (Reess-Hansen).**

Il développe dans du moût une végétation qui se rapproche le plus des formes cellulaires, auxquelles Reess a donné ce nom. Il est cependant impossible d'établir si cet auteur avait eu en vue précisément cette espèce, attendu que de pareilles petites formes cellulaires peuvent être produites par chacune des espèces de *Saccharomyces*, et que, dans de certaines conditions, elles se produisent même avec prédominance.

La formation de spores et de voiles est peu abondante ; par contre, cette espèce donne lieu à une formation de ceinture de levure bien marquée. Les cellules des voiles ressemblent à celles de la levure du dépôt, cependant les petites cellules et les courtes formes tubulées sont plus fréquentes.

Cette espèce a été trouvée par Hansen dans de la levure pressée. Vis-à-vis des sucres, elle se comporte à peu près comme l'espèce précédente, cependant, elle manifeste une activité fermentative plus énergique dans des solutions de saccharose et de dextrose. Cultivée dans du moût de bière, elle ne produit comme l'espèce précédente, que de faibles quantités d'alcool. Elle ne provoque aucune fermentation dans des solutions de maltose. Elle intervertit la saccharose.

Des expériences de Hansen, faites dans la pratique, ont montré que cette espèce ne détermine pas de maladie dans la bière, lors même qu'elle serait ajoutée en très

fortes proportions au commencement ou à la fin de la fermentation principale, ou à la fin de la conserve en cave. Ceci est d'un intérêt particulier, étant donné qu'antérieurement on avait beaucoup parlé du *Saccharomyces exiguus* comme levure de maladie.

Quelques autres espèces de *Saccharomyces* préalablement examinées par Hansen peuvent, comme les deux que nous venons de décrire, faire fermenter la saccharose et la dextrose, mais non pas la maltose et la lactose.

A ce groupe de *Saccharomyces*, il faut encore ajouter le

Saccharomyces Joergensenii

qui a été décrit par Lasché. La végétation consiste en petites cellules rondes ou ovales. L'optimum pour la sporulation est 25° C., les températures limites pour cette fonction sont 8° C. et 30° C. A des températures supérieures à 30° C., la végétation dépérit rapidement. Une vraie formation de voile n'a pas été observée; dans de vieilles cultures on n'observe qu'une formation très faible de ceinture de levure aux cellules rondes ou ovales. Sur de la gélatine, cette espèce développe des colonies ressemblant à celles de la levure basse de brasserie. Le moût gélatiné se liquéfie lentement par son action. La culture en stries est de couleur gris sale et a des bords lisses. Cette espèce ne fait pas fermenter la maltose mais bien la saccharose et la dextrose. Dans des mélanges avec des levures de culture dans du moût de malt son développement est par conséquent entravé. D'après l'auteur sus-nommé, cette espèce provoquerait un fort trouble dans la « bière de tempérance. »

Saccharomyces membranæfaciens. Hansen.

Cette espèce singulière, qui occupe une place toute particulière parmi les *Saccharomyces*, forme très rapidement, cultivée dans du moût, sur toute la surface du liquide, un voile très fort, d'aspect grisâtre et plissé. Celui-ci est composé principalement de cellules ovales et allongées, riches en vacuoles et paraissant en général plus ou moins vides. Il reste de l'air en abondance entre les différentes colonies.

Les spores se développent d'une manière luxuriante, non seulement dans les conditions de culture ordinaires, mais même dans les voiles. Elles affectent des formes très irrégulières et germent dans la chambre humide de Ranvier au bout de 10 à 19 heures, à la température ordinaire d'un appartement.

Sur du moût gélatiné, les cellules forment des taches d'un gris mat, tirant souvent, mais faiblement, sur le rouge. Ces taches sont arrondies et s'étendent en une surface plissée. Les taches renfermées dans la gélatine, au contraire, ont un aspect tout différent. La gélatine devient liquide par l'action de ce champignon.

Cette espèce n'est pas capable de faire fermenter la saccharose et la dextrose, pas plus que la maltose ou la lactose, et elle n'intervertit par la saccharose. Elle a été observée dans le mucilage sur les racines de l'orme; elle montre une grande ressemblance avec les espèces *Mycoderma cerevisiæ* et *Mycoderma vini*, mais elle est un véritable *Saccharomyces*.

La température maximale de sporulation est 33-33 1/2° C, la température minimale entre 3° et 6° C; l'optimum se trouve aux environs de 30° C. (17-18 heures). (Nielsen).

Köhler la rencontra dans de l'eau de puits très sale.

Au laboratoire de l'auteur de ce livre, on a trouvé cette espèce dans des *vins clairs*.

Pichi fit la description de deux espèces de *Saccharomyces* qui ressemblent au *Saccharomyces membranæ-faciens*.

D'autres espèces formant rapidement un voile sans provoquer de fermentation, sont le *Sacch. hyalosporus* à spores sphériques, qui développe un voile mince sur du moût, et le *Sacch. farinosus*, produisant sur le moût un voile blanc, plissé, comme saupoudré de farine. La végétation consiste en longues cellules qui présentent sur du moût gélatinisé des formes très irrégulières (1). (*Lintner.*)

Saccharomyces Hansenii. Zopf.

Celui-ci fut découvert par Zopf parmi les champignons qui se trouvent dans la farine des graines du cotonnier. Les spores sont sphériques, d'un très petit diamètre, et il ne s'en développe qu'une seule ou deux tout au plus dans la cellule-mère. Dans des liquides nourriciers sucrés et fermentescibles, il ne provoque pas de fermentation alcoolique, mais dans ce qui se dépose au fond des ballons, on trouve des cristaux d'oxalate de chaux. Zopf trouva des formations de ce genre dans des solutions nutritives contenant de la galactose,

(1) Une autre espèce qui, sur gélatine, développe également des formes cellulaires très bizarres, amibiformes, est le *Sacch. Bailii*, décrit par le même auteur. Elle provoque dans du moût des phénomènes zymotiques très prononcés, fait fermenter la dextrose et le sucre de canne, et ne forme qu'une trace de voile.

de la glucose, du sucre de canne, du sucre de lait, de la maltose, de la dulcité, de la glycérine, et de la mannite.

Saccharomyces Ludwigii. Hansen.

(Fig. 40, 41 et 60)

Cette espèce curieuse qui a été découverte par Ludwig, dans le mucilage du chêne vivant, est la seule parmi les *Saccharomyces* connus, dont l'identité puisse être établie par un simple examen microscopique. Donnons-en ici la description d'après les recherches de Hansen. Les dimensions des cellules varient beaucoup ; on en trouve des elliptiques, quelques-unes en forme de flacon, d'autres allongées, tubuleuses, souvent d'autres encore affectant la forme d'un citron. Dans toutes les agglomérations de ces cellules, il peut se trouver des cloisons. Comme pour la plupart des *Saccharomyces*, les taches végétatives sont, dans le moût gélatiné, rondes, gris-clair ou jaune-pâle. Dans du moût, ce champignon ne produit, même après une fermentation de longue durée, que 1,2 0/0 d'alcool en volume ; concordant avec ceci, il faut remarquer que la maltose ne fermente pas par l'action de cette espèce. Dans des solutions de dextrose, il se produit par contre jusqu'à 10 0/0 d'alcool en volume. Des solutions de saccharose sont interverties ; il ne provoque aucune fermentation dans des solutions de lactose et de dextrine, et aucune production de sucre dans de l'eau amidonnée. Des spores se forment facilement dans des solutions aqueuses de saccharose, sur du moût gélatiné, ainsi que dans de l'eau de levure et dans du moût, dans ce dernier cas, même lorsqu'il n'y a encore aucune formation de voile.

Ce qui constitue une particularité importante de cette

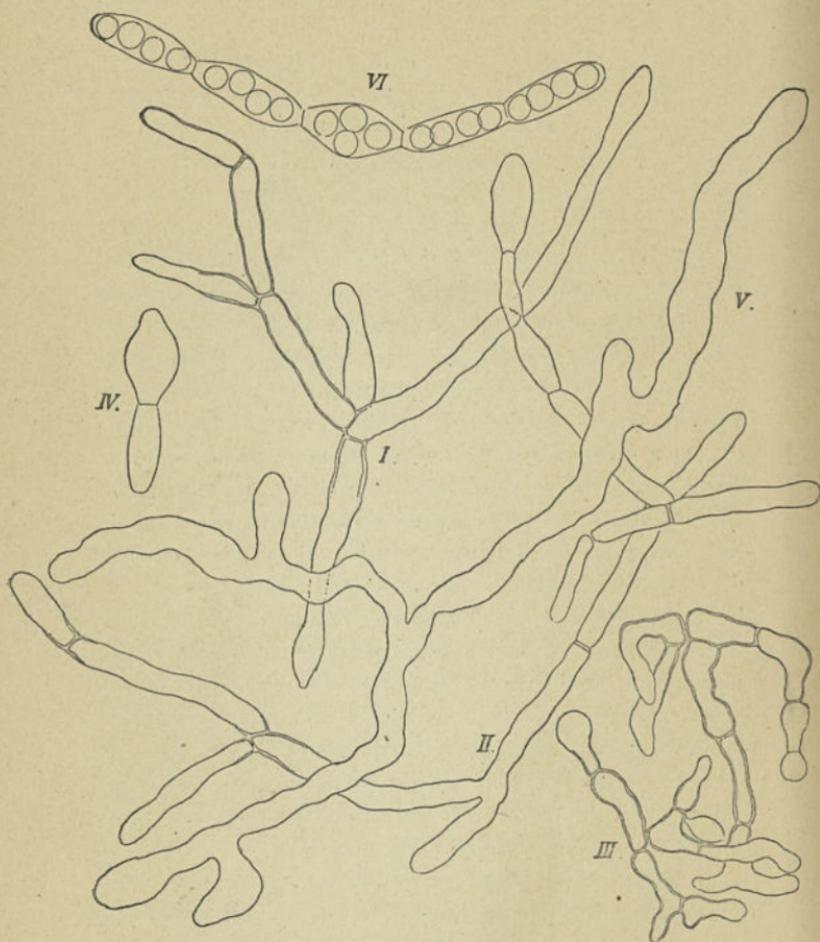


FIG. 60.

Saccharomyces Ludwigii.

Ancienne formation de voiles et d'un mycélium, d'après Hansen.

espèce, c'est que les spores, principalement lorsqu'elles

sont jeunes et qu'elles ont germé, se fusionnent, et que les nouvelles formations ainsi produites continuent à pousser pour produire enfin un tube germinatif (promycélium), dont il se sépare peu à peu de nouvelles cellules de levure par des parois transversales nettement accusées. Les extrémités de ces cellules de levure poussent de nouveaux bourgeons, qui sont également délimités par des parois transversales.

Dans de vieilles cultures, il y a une grande prédisposition pour la formation d'un mycélium, mais on ne trouve que rarement et qu'exceptionnellement des groupes dont les membres soient fortement reliés entre eux et qui ne montrent que des étranglements peu accentués. Ces parties sont munies de parois transversales droites bien marquées. Chacune des cellules de ces colonies peut pousser des bourgeons et des spores. On trouve quelquefois des cellules bizarres et de très grandes cellules fortement ramifiées.

Ce qu'il y a de caractéristique pour cette espèce, c'est que les cellules peuvent périr dans une solution aqueuse de saccharose déjà au bout de deux ans, tandis que la plupart des autres *Saccharomyces* étudiés jusqu'à maintenant, vivent ordinairement bien plus longtemps dans un pareil liquide.

Le maximum de la température de sporulation est de 32° à 32 1/2° C., le minimum se trouve entre 3° et 6° C., l'optimum est situé entre 30° et 31° C., (18-20 heures). (Nielsen.)

Au *Sacch. Ludwigi*, se rattache une série d'espèces découvertes plus tard, chez lesquelles le bourgeonnement a complètement disparu et dont les cellules ne se multiplient que par division.

Le *Saccharomyces* (*Schizosaccharomyces*) *octosporus*, a été découvert par Beyerinck, sur des raisins de Corinthe et observé plus tard au laboratoire de l'auteur, par

Schiönning, en examinant une végétation sur des raisins secs. La multiplication s'effectue de la façon suivante (Fig. 61) : environ au milieu de la cellule apparaît une cloison; celle-ci se fend en donnant naissance à deux nouvelles cellules, qui s'arrondissent et tournent autour d'un point de la cloison, où elles restent constamment accolées, de sorte que finalement elles sont presque parallèles. Enfin elles se séparent complètement en prenant une forme ellip-

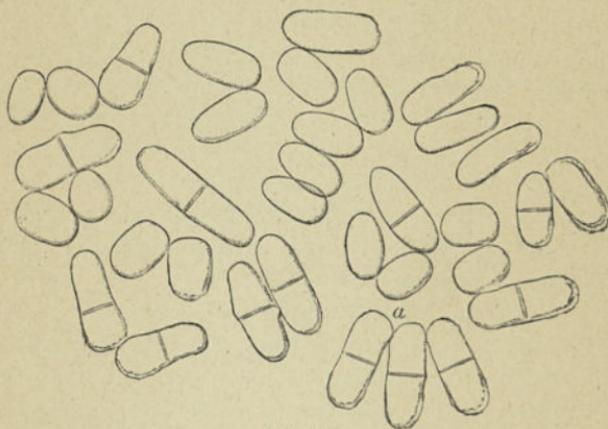


FIG. 61.

Saccharomyces octosporus.

Jeune végétation après 24 heures de culture dans du moût de bière à 25°, d'après *Schiönning*.

soïdale ou ovale ; puis elles s'allongent, et la division recommence de la même manière. Mais il arrive aussi que deux cellules, restées unies tout le long de la cloison, s'allongent et forment de nouvelles cloisons. de sorte que la cellule mère primitive se trouve partagée en quatre ou plus de cellules. Dès le début de la fermentation dans du moût à 25°, les cellules développent des endospores, mais la sporulation reste faible, soit qu'elle s'effectue dans les conditions ordinaires dans du moût, soit en culture sur

des blocs de plâtre humide. Ce développement est bien plus vigoureux à la surface de gélatines nutritives, par exemple sur du moût gélatinisé (Fig. 63), où la végétation forme des taches bombées, rondes, céracées, avec un renforcement en leur milieu. Après s'être développées pendant quelque temps à la température de la chambre, les cellules se raccourcissent et s'arrondissent, et, suivant les observations de Schiønning, au laboratoire de Carlsberg, la formation des asques se fait de la manière suivante (Fig. 62) : La cellule arrondie s'allonge et il apparaît une cloison qui se partage, après quoi, les deux nouvelles cellules ne font que se toucher ou sont accolées à un point. Puis elles se fusionnent de nouveau — com-

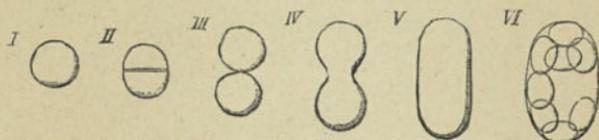


FIG. 62.

Saccharomyces octosporus.

Développement de l'asque, d'après Schiønning.

parez les fusions chez le *Sacch. Ludwigii* observées par Hansen — et forment enfin une cellule prolongée ellipsoïdale, soit munie d'étranglements, soit irrégulière, qui gagne peu à peu en circonférence. Dans cette cellule se forme un nombre différent de spores, dans la règle huit. Peu à peu la paroi de la cellule-mère se dissout, et les spores sont alors logés dans une couche gélifiée qui disparaît plus tard. Les spores sont souvent ellipsoïdales et, suivant Lindner, leur membrane est colorée en bleu par une solution iodée d'iodure de potassium.

Souvent on peut observer aux cellules végétatives aussi bien qu'aux asques, des lignes ténues marquant la limite entre les parties anciennes, compactes, de la paroi cellu-

laire et les parties minces, nouvellement formées. Ces dernières apparaissent, soit après la séparation des cloisons formant alors les parois terminales des nouvelles cellules, soit après leur diffluence, par la croissance de l'asque qui se produit ensuite.

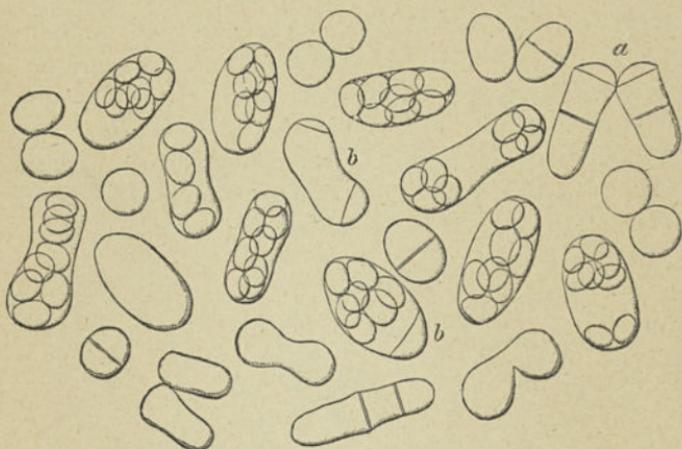


FIG. 63.

Saccharomyces octosporus.

Jeune végétation dans du moût gélatinisé, d'après *Schönning*.

Sur du moût on n'a observé aucun voile, mais seulement un faible anneau de levure.

Cette espèce fait fermenter la maltose et la dextrose, mais non pas le saccharose qu'elle n'intervertit non plus. D'après *Fischer*, un extrait aqueux de la végétation desséchée, pulvérisée, décompose la maltose, mais n'exerce, par contre, aucune influence sur la saccharose.

Saccharomyces Comesii.

Ce *Saccharomyces* a été décrit par *Cavara* en 1893. Il vit en parasite ou en saprophyte sur les panicules et les tiges du millet, et forme, suivant *Cavara*, un mycélium, consistant en hyphes cylindriques cloisonnées, qui produisent des conidies cylindriques, ou allongées en ellipsoïde, isolées ou réunies en chaînes, mesurant de 7-9 μ de longueur et de 2 à 3 μ de largeur.

Les spores sont sphériques et chaque cellule en contient de 2 à 4. Cette espèce concorde donc aussi avec le *Sacch. Ludwigii* en ce sens, qu'elle n'est pas un champignon bourgeonnant typique, et l'auteur fait observer que dans la germination des spores, il y a également fusion.

Le *Saccharomyces* (*Schizosaccharomyces*) *Pombe* a été découvert par *Saare* et *Zeidler* dans de la bière de millet d'Afrique et décrit par *Lindner*. Cette espèce se rattache intimement à la précédente, attendu que ses cellules se multiplient aussi par cloisonnement et séparation ; souvent les deux nouvelles cellules restent pendant quelque temps unies en un seul point, autour duquel elles tournent, de façon à former ensemble un angle aigu. Les cellules ressemblent aux conidies de l'*Oidium* ; beaucoup rappellent par leur structure la manière dont elles sont nées, c'est-à-dire qu'une extrémité est arrondie, tandis que l'autre est entourée d'un anneau bien dessiné, renfermant le morceau de membrane nouvellement formé, gonflé en forme de sphère. Dans les cellules apparaissent de 1 à 4 spores qui germent comme chez le *Sacch. Ludwigii*, en développant un tube germinatif. On n'a cepen-

dant pas pu observer une fusion du promycélium des spores.

La végétation ne forme pas de voile sur du moût. Sur du moût gélatinisé elle développe une couche compacte à fines cannelures.

A son optimum de température, qui se trouve de 30 à 33°, cette espèce manifeste des phénomènes de fermentation haute. Elle se distingue par les quantités considérables d'acide qu'elle fournit pendant la fermentation et elle possède une grande force de résistance vis-à-vis de bactéries concurrentes. Elle provoque une assez forte fermentation dans du moût de bière, et fait aussi fermenter des solutions de dextrose et de sucre de canne.

Suivant des recherches de *Rothenbach*, elle fait fermenter environ de moitié une diastase-dextrine, préparée d'après les indications de *Lintner* ; il se forme alors un résidu d'achroodextrine, qui, après addition d'alcool, se dégage au bout de quelque temps, sous forme de cristaux sphéroïdaux.

Cette espèce étant à même de produire des quantités notables d'alcool, on serait tenté de croire qu'elle pourrait être appliquée avec avantage dans la pratique industrielle. Des essais effectués dans cette direction n'ont cependant donné aucun résultat jusqu'à présent.

Dans la fermentation du *rhum de mélasse* aux Iles, on rencontre deux types de levures différents. Dans certaines contrées, la forme ellipsoïde prédomine, mais dans d'autres, c'est un *Saccharomyces* ressemblant aux moisissures. *Vordermann* et *Eykmann* ont toujours trouvé à *Java*, dans la fermentation de l'*arack* de mélasse, un champignon détachant par cloisonnement de nouvelles cellules, mais aucune sporulation ne put être constatée, et suivant *Eykmann*, ce champignon rappellerait dans ses formes de croissance celles des *Hyphomycètes*. Dans le cours de ses études au laboratoire de l'auteur, *P. Greg*

trouva dans de la mélasse de sucre de canne, utilisée à la Jamaïque dans la fermentation du rhum, un *Saccharomycète* avec des formes de croissance analogues :

***Saccharomyces mellacei* n. sp.**

(Fig. 64 et 65.)

Les études détaillées que *J. Chr. Holm* et l'auteur de

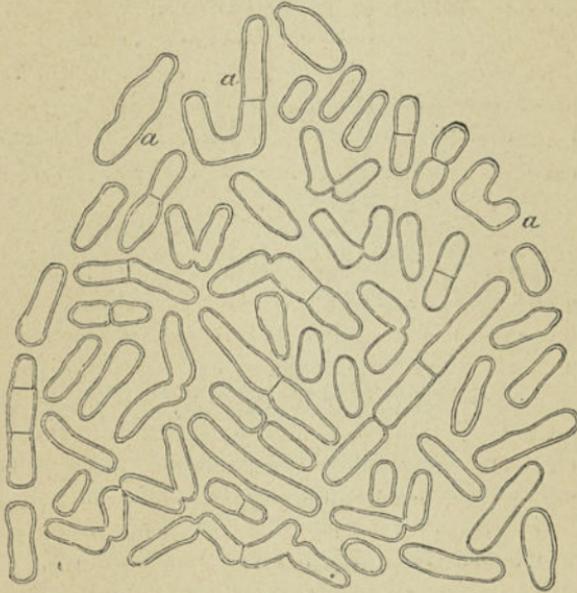


FIG. 64.

Saccharomyces mellacei.

Jeune culture dans du moût de bière. a cellules de cultures âgées de huit jours.

Dessin de *Holm*, d'après nature.

ce livre ont fait sur cette espèce, que nous voudrions ap-

peler *Saccharomyces mellacei*, ont fourni les résultats suivants : Fermentée dans du moût de bière à 23°, dans des cylindres en verre, cette espèce montre des signes de fermentation haute et forme un dépôt caséux, peu compacte. Pendant la fermentation, elle dégage un arôme agréable. Dans du moût de 10, 5 0/0 Balling, elle produit environ 2 1/2 0/0 d'alcool en volume.

Dans ses formes végétatives, cette espèce rappelle les *Saccharomyces octosporus*, *Saccharomyces Pombe*, etc. Les vieilles cultures présentent des formes cellulaires parti-

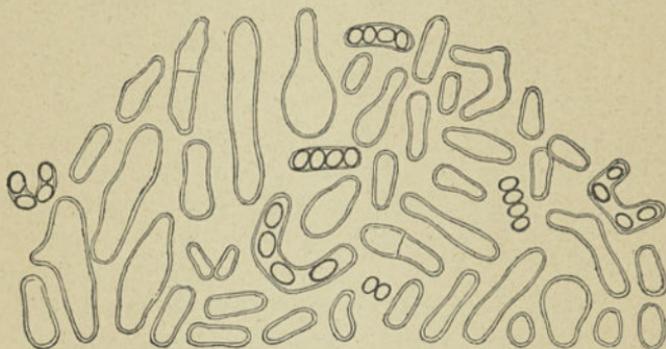


FIG. 65.

Saccharomyces mellacei.

Végétation de l'anneau de levure dans du moût de bière.
Dessin de Holm, d'après nature.

culières, très bizarres (Fig 64, 65), que l'on retrouve également pendant la fermentation. On ne put observer de voile sur des cultures dans du moût âgées de 5 mois, mais seulement un anneau de levure. Les vieilles cultures ne décolorent pas le liquide.

Les spores (Fig. 65) sont longues et arrondies. Elles apparaissent dans toutes les formes cellulaires, ordinairement à 4 par cellule ; elles sont très réfringentes, et, suivant les recherches de Holm, colorées en bleu par l'iode de potassium iodé.

Les cultures sur plaques et celles en stries offrent des végétations ayant à leur surface aussi bien qu'en profondeur, un contour nettement marqué ; les formes cellulaires sont les mêmes que dans le liquide. Souvent il se présente des cellules ressemblant aux conidies de *Oidium lactis*.

Suivant les recherches effectuées par *P. Greg* dans notre laboratoire, on rencontre souvent, dans les espèces ou races appartenant à ce type, des inégalités essentielles et durables, soit sous le rapport de l'arome du liquide fermentant — quelques-unes fournissent un distillat nauséabond, — soit concernant le temps écoulé jusqu'à la fin de la fermentation dans le même mélange de mélasse stérilisée et de dunder, toutes choses égales d'ailleurs. Dans ces essais, la quantité d'alcool variait chez les différents types entre 6,6 et 7,6 0/0 en volume. La rapidité de multiplication montrait également de grandes différences chez les diverses espèces. — On trouvera de plus amples détails, concernant les essais effectués en pratique, dans des mémoires de *Greg*, ainsi que dans ceux de *Hart*, sur des fermentations du rhum avec des espèces ellipsoïdes.

Saccharomyces acidi lactici. Grotenfelt.

Grotenfelt décrit sous ce nom un *Saccharomyces* qui, introduit dans du lait stérilisé, provoque une coagulation intense et en même temps une formation d'acide ; sur la gélatine et sur l'agar, il forme des colonies blanches, d'un brillant de porcelaine ; sur des tranches de pomme de terre, il forme de larges taches humides, d'un gris clair, qui passent bientôt au brun. Dans les cul-

tures par piqûre sur gélatine, il s'y développe des gibbosités en forme de poire, partant des piqûres. Les cellules sont ellipsoïdales ; longueur 2,0—4,33 μ , épaisseur 1,50—2,90 μ .

En ensemençant une solution de lactose additionnée de carbonate de chaux, on put obtenir de l'alcool par la distillation. Introduit dans une solution neutre de lactose à 30/0 le *Saccharomyces acidi lactici* forma 0,108 0/0 d'alcool dans l'espace de huit jours.

***Saccharomyces fragilis*, n. sp.**

(Fig. 66 et 67).

Tandis que les champignons bourgeonnants, rencontrés dans le képhir, dont d'autres chercheurs ont donné la description, ne sont pas sporogènes, on a découvert au

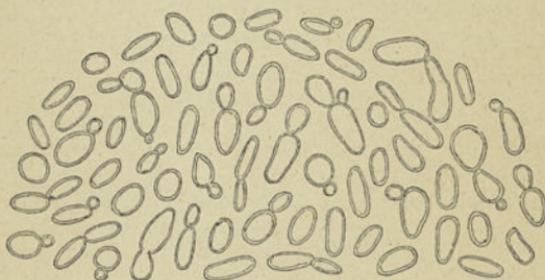


Fig. 66.

Saccharomyces fragilis.

Jeune végétation dans de l'eau de levure additionnée de lactose.
Dessiné par Holm, d'après nature.

laboratoire de l'auteur de ce livre, un vrai *Saccharomyces*, que nous avons nommé *Saccharomyces fragilis*, à cause du peu de résistance qu'offre sa paroi cellulaire.

La végétation consiste en cellules relativement petites, ovales ou allongées (Fig. 66) d'une réfringence particulière mais faible. A la température ordinaire d'une chambre, elle se comporte comme levure basse. En culture sur blocs de plâtre, à 25°, la sporulation apparaît distinctement au bout de 20 heures, et après 40 heures, on peut déjà observer un assez grand nombre de spores libres (Fig. 67); à 13°, la sporulation se manifeste au bout de 40 heures environ. La forme *allongée et arrondie* des spores est caractéristique. Les végétations sporogènes se développent aussi dans des liquides fermentants et sur gélatine, et dans tous les cas, les spores deviennent bientôt libres. Après un repos assez long, la végétation produit un faible voile, dont les formes cellulaires ne dévient ordinairement que peu de celles de la levure déposée. Cultivées sur plaques, les colonies de surface ressemblent à des voiles et diffluent au bout de quelques jours à la température d'une chambre, tandis que les colonies profondes montrent des contours très poilus, ressemblant à un mycélium.



FIG. 67.

Saccharomyces fragilis.
Formation des spores.
Dessiné par Holm, d'après nature.

Dans de l'eau de levure additionnée de lactose (à 10 0/0), cette espèce fournit, au bout de huit jours, à la température ordinaire d'une chambre, environ 1 0/0, après 2 mois jusque 4 0/0, d'alcool en poids. En même temps une formation d'acide eut lieu. Dans du moût houblonné (d'environ 11 0/0 Balling), cette levure forma, à la même température, au bout de 10 jours environ 1 0/0 d'alcool en poids.

La température optimale pour le développement de cette espèce se trouve à peu près à 30°.

D'après des expériences de *Bau* elle fait complètement fermenter la lactose, mais non pas la mélibiose.

Saccharomyces minor. Engel.

Les cellules végétatives sont absolument sphériques, elles ont jusqu'à 6 μ de diamètre, et sont réunies en chaînettes ou en petits flocons de 6 à 9 cellules. Les cellules sporifères ont de 7-8 μ et contiennent de 2-4 spores de 3 μ de diamètre.

D'après l'auteur mentionné, cet organisme est le ferment le plus actif dans la fermentation panaire (1).

(1) Des essais décisifs sur les *agents essentiellement actifs dans la panification* n'ont pas encore été faits jusqu'à présent. Pour le pain blanc on emploie ordinairement la « levure pressée », dont la masse principale est composée de ferments alcooliques, et la levure est le seul ferment actif. Pour la préparation du pain bis, et dans certaines contrées pour celle du pain blanc, on emploie le « levain », c'est-à-dire de la pâte aigrie, pétrie avec de la farine, du son et de l'eau, qui sert à provoquer la fermentation spontanée. Ce levain contient un grand nombre de bactéries, et des cellules ressemblant aux levures, parmi lesquelles se trouvent aussi des ferments alcooliques. Les opinions sont très divisées en ce qui concerne l'importance de ces différents organismes pour la fermentation du pain bis.

Suivant Chicandard (1883) et Marcano, c'est une bactérie qui serait le ferment actif. Boutroux ramena la fermentation tant à l'action des bactéries qu'à celles des champignons bourgeonnants. Il mit plus tard l'activité de la levure alcoolique en première ligne. Laurent indiqua le *bacillus panificans* comme étant le principal auteur de la panification. Les recherches de Dünninger eurent pour résultat, que les champignons bourgeonnants seuls devaient être considérés comme organismes essentiels dans la fermentation panaire ; la levée de la pâte est produite en première ligne par l'acide

Saccharomyces anomalus. Hansen.

(Fig. 42 et 68).

Cette espèce très particulière a été trouvée par *Hansen* dans une levure de brasserie impure de Bavière. Dans le moût, elle provoque une fermentation rapide et vigoureuse, et forme dès le début de la fermentation, un voile gris mat.

Pendant sa fermentation, le liquide dégage une odeur de fruits éthérée.

Dans le moût, les cellules sont petites, ovales et sont quelquefois allongées en forme de boudin : vues au microscope, elles rappellent les espèces de *Torula*. Quand le développement a duré un certain temps, il se présente,

carbonique qui se dégage par la fermentation alcoolique, puis par l'expansion, respectivement par la gazéification de l'air, de l'alcool, de l'eau et des acides sébaciques volatils produits par les bactéries, Peters trouva dans le levain quatre champignons bourgeonnants différents, dont le premier est à identifier avec le *Saccharomyces minor Engel*. Le deuxième est à peu près de la même grandeur que le *Saccharomyces minor* ; ses cellules sont ovoïdes, et dans des liquides nutritifs elles se groupent en colonies assez grandes, continues, fortement ramifiées : il forme de nombreuses spores. Enfin on trouva encore une espèce de mycoderma, et une autre que l'on ramène au *Saccharomyces cerevisiae*. Peters décrit plusieurs espèces de bactéries du levain, sans cependant faire mention d'aucune possédant toutes les qualités du *Bacillus panificans* de Laurent ; on trouva au contraire plusieurs bactéries qui se partagent ces propriétés. Il est donc probable que Laurent avait opéré sur des cultures impures. Ces bactéries ne provoquaient ni fermentation

dans la levure déposée et dans le voile, beaucoup de cellules avec des spores.

Les spores poussent dans différents milieux nourriciers, tant liquides que solides, même dans des circonstances où les cellules-mères ont de la nourriture en abondance.

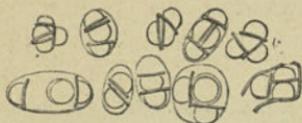


FIG. 68.

Spores du *Saccharomyces anomalous*, d'après Hansen. Quelques spores sont détachées, d'autres sont renfermées dans la cellule-mère. A droite, en bas, on voit la paroi déchirée d'une cellule-mère qui renferme encore trois spores.

La forme des spores (Fig. 68) est très caractéristique; elles ressemblent à un hémisphère, avec un filet saillant partant de la base. Pendant la germination, elles gonflent et détachent des bourgeons (voir Fig. 42).

La température maximale de sporulation se trouve de

alcoolique, ni développement de gaz considérable dans la farine stérilisée.

Dans ses recherches sur le levain de boulangerie *Lehmann* a trouvé tout récemment qu'une seule espèce de bactérie, à laquelle il donne le nom de *Bacillus levans*, y prédomine. Celle-ci formée dans du bouillon sucré de l'acide lactique et de l'acide acétique avec dégagement d'acide carbonique et d'hydrogène et peut mettre en fermentation de la farine stérilisée. Sous certains rapports cette bactérie manifeste les mêmes caractères que le *Bacillus coli communis*.

L'auteur cité admet que la levure présente dans le levain de boulanger joue aussi un rôle dans ce procès.

Les recherches que nous venons de mentionner constituent d'excellents travaux préparatoires pour des expériences décisives sur la cause et l'effet quand la pâte du pain lève.

Les maladies du pain bis — formation abondante de moisissures, pain devenant visqueux pour cause de surabondance des bactéries, — découvertes par *Uffelmann*, *Kretschmer* et *Niemitowicz*, peuvent bien être mises sur le compte de l'impureté du levain, où les différents organismes se développent.

32° à 32° 1/2 C., le température minimale de 3° à 6° C., l'optimum est situé entre 28 et 31° C. (17 1/2 à 19 heures). (Nielsen).

Après que Hansen eût attiré l'attention sur l'espèce remarquable de *Saccharomyces* sus-mentionnée, Holm, Lindner et Will l'ont aussi examinée, ainsi que d'autres espèces qui s'en rapprochent, et qu'ils avaient également trouvées dans de la levure de brasserie impure. Les levures avec des spores en forme de chapeau ne paraissent donc pas être rares.

Dans de la bière de fermentation haute anglaise, devenue trouble ("fretty"), l'auteur de ce livre a observé une espèce appartenant à ce groupe, qui se développait avec tant d'énergie, qu'elle avait refoulé toutes les autres espèces de levure. Celle-ci se manifesta visiblement comme levure de maladie troublant la bière.

Comme cela a été dit précédemment, les spores de ce champignon ont de la ressemblance avec celles de l'*Endomyces decipiens*, et il existe peut-être un rapport plus intime entre ce *Saccharomyces* et ce champignon. On n'a cependant encore aucune preuve à l'appui.

***Saccharomyces conglomeratus*. Reess.**

A été représenté ainsi par Reess : « Cellules bourgeonnantes rondes, de 3-6 μ de diamètre, réunies en grappes. La formation de ces grappes a lieu de la manière suivante : sur l'axe de deux vieilles cellules, avant que celles-ci ne poussent par bourgeonnement dans la direc-

tion de leur axe longitudinal, toute une série de cellules, il se forme, la plupart du temps, simultanément, plusieurs bourgeons qui se ramifient. Les asques sont très fréquemment réunis deux à deux ou chacun avec une cellule végétative. Spores 2-4 qui, pendant la germination, donnent naissance à de nouvelles touffes. Sur des raisins en pourriture ou dans de la levure de vin, au début de la fermentation. Action fermentative problématique. »

Dans les cultures de voiles des *Saccharomyces* de *Hansen*, il se présente des colonies de cellules ayant l'aspect décrit plus haut, dans les vieux voiles des six espèces étudiées en premier lieu par lui. Comme ce savant ne trouva jamais une espèce bien déterminée, pouvant être identifiée avec le *Saccharomyces conglomeratus* de Reess, il est porté à croire que les colonies des cellules dont il est question dans les différents *Saccharomyces*, sont identiques à cette espèce.

Citons enfin encore le

***Saccharomyces guttulatus*. Buscal**

Cryptococcus guttul. Rob.

découvert par *Remack* et *Robin*, et étudié plus tard exactement par *Buscalioni*, qui paraît vivre en vrai parasite.

Cette espèce vit et pullule dans le canal intestinal de divers mammifères, de certains oiseaux et reptiles. La végétation consiste en très grandes cellules allongées, ellipsoïdales, foncées, d'environ 20 μ de longueur. La sporulation a été observée dans les excréments de lapins. Les spores sont allongées, de forme à peu près analogue à

celle de la cellule-mère, et sont entourées d'une membrane à doubles contours nettement marqués. Chaque cellule contient de 1 à 4 spores, mais ordinairement rien que 2. Après leur affranchissement, qui se fait assez rapidement, la membrane de la cellule-mère paraît se résorber. La germination des spores ne semble guère être possible que dans l'estomac des animaux (1).

(1) L'action des espèces de levure *sur l'organisme humain et animal* a été étudiée, dans ces dernières années, avec des cultures pures. Déjà *Simanowsky* avait indiqué que la levure de bières troubles provoque des altérations des sucs gastriques et pancréatiques, et qu'une telle bière occasionne un catarrhe du canal intestinal. *Neumayer* a constaté que les espèces de levure qu'il avait examinées, sont très résistantes à l'action des sucs gastriques et peuvent traverser l'intestin de l'homme ou d'animaux, sans être détruites. Introduites sans substances fermentescibles dans le canal intestinal, les espèces étudiées — levure de culture ou levure sauvage — n'exerçaient aucune influence, tandis qu'elles provoquaient toutes des catarrhes d'estomac et d'intestin, lorsqu'elles s'y trouvaient mêlées à des solutions sucrées, dans lesquelles elles pouvaient susciter une fermentation énergique. D'après l'auteur cité, cette action serait due à la présence de produits de fermentation anormaux, sécrétés par la levure pendant son développement à la température élevée du corps, produits qui exercent une mauvaise influence sur les muqueuses du canal intestinal.

Des expériences ultérieures, principalement celles de *Fermi* et *L. Rabinowitsch* ont démontré qu'il existe des levures qui, introduites par inoculation sous-cutanée, se développent et se multiplient énergiquement dans les tissus, et peuvent provoquer des maladies même mortelles. D'après l'analyse botanique, ces espèces seraient à classer parmi les levures dites sauvages. On a également observé que certaines espèces de *Monilia* possèdent des propriétés pathogéniques.

LEVURES DE CULTURE.

Une espèce ou race de levure est appelée « levure de culture » quand, après un choix méthodique fait selon le but particulier que l'on se propose, elle peut être mise à profit dans la pratique industrielle. Un grand nombre de ces espèces de levures de culture accusent des différences microscopiques à l'égard des espèces de levures « sauvages » qui se présentent dans la même branche de l'industrie, comme il a été démontré plus haut, par exemple concernant la structure des spores.

Les différentes races ou espèces de levure peuvent être divisées en deux groupes suivant l'aspect de la fermentation : en *levure basse* et en *levure haute*. Malgré de nombreuses affirmations, il a été impossible, jusqu'à présent, de convertir véritablement la levure basse en levure haute, et *vice versa*. Suivant les observations de Hansen et Kühle, une levure de fermentation basse peut facilement produire des phénomènes passagers de fermentation haute; mais ceux-ci disparaissent rapidement avec le développement progressif de la levure. Si donc on a soutenu autrefois que la levure basse, par exemple, pouvait être convertie en levure haute au moyen d'une culture conséquente à haute température, ces anciennes expériences ne peuvent être expliquées qu'en admettant que la levure basse était impure, et qu'elle contenait une certaine quantité de levure haute, qui, s'étant peu à peu développée à des températures élevées aux dépens de la le-

vure basse, finit par constituer la masse principale de toute la levure (1).

Comme exemple de deux races différentes de levure basse, nous citerons les *levures basses* « n° 1 » (Fig. 69) et

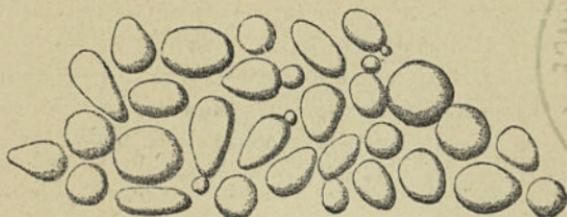


FIG. 69.

Levure basse n° 1 de Carlsberg, d'après Hansen.

« n° 2 » (Fig. 70) de Carlsberg, qui sont employées dans la brasserie du *Vieux-Carlsberg*, près Copenhague, et dont nous allons donner une description un peu détaillée. Déjà le simple examen microscopique nous décèle des différences distinctes :

L'espèce n° 1 (Fig. 69) a des cellules plutôt allongées, parmi lesquelles on distingue des individus caractéristiques plus petits, terminés en pointe. Lorsque la levure a été sortie de la cuve, lavée à l'eau et tenue peu de temps sous la glace, on remarque que le contenu de toutes les

(1) *Loiseau et Bau* ont établi, au point de vue *chimique*, une différence caractéristique entre les espèces de levures *hautes* et *basses* utilisées en brasserie. Les levures basses firent complètement fermenter la mélibiose et la méltriose; les levures hautes ne firent pas fermenter la mélibiose et décomposèrent la méltriose en fructose, qui fut fermentée, et en mélibiose. Suivant ces auteurs et d'après *Fischer*, la mélibiose est décomposée par un enzyme de la levure basse, avant d'être fermentée. *Fischer* ne réussit pas à constater la présence d'un enzyme de ce genre, producteur de la mélibiose dans les levures hautes examinées.

cellules devient très rapidement granuleux, et que, si on la conserve pendant plusieurs jours par le moyen indiqué, le nombre des cellules mortes augmente rapidement. Les cellules, de l'espèce n° 2 (Fig. 70), prises de la cuve dans des conditions normales, sont courtes et ovales, plusieurs presque sphériques; ça et là apparaissent des cellules géantes (à gauche dans la figure). Dans la masse de levure, lavée à l'eau, les cellules conservent très longtemps leur contenu hyalin, faiblement granuleux, et la levure conservée de cette manière pendant assez longtemps ne montre que très peu de cellules mortes.

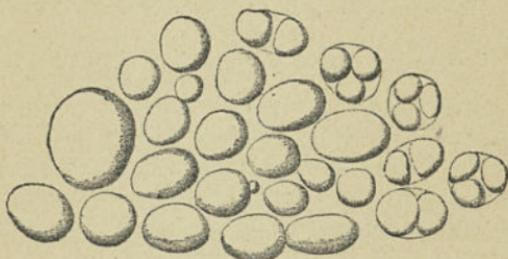


FIG. 70.

Levuré basses n° 2 de Carlsberg (quelques cellules contenant des spores), d'après Hansen.

Cultivées dans de la gélatine, les deux espèces forment des colonies ayant l'aspect ordinaire de celles des *Saccharomyces*.

Dans les cultures sur blocs de plâtre, l'espèce n° 2 développe ses spores beaucoup plus rapidement et en plus grand nombre que l'espèce n° 1.

Dans la cuve, les phénomènes de la fermentation sont aussi très différents: le n° 2 donne une mousse très haute et compacte, et un couvercle épais; le n° 1 forme une mousse basse, qui souvent ne recouvre pas entièrement la surface du liquide en fermentation, mais laisse des places nues. Le n° 2 produit assez rapidement la

clarification, tandis que cela n'a lieu que très lentement avec le n° 1. La levure n° 2 se dépose en couche consistante au fond de la cuve, tandis que la levure n° 1 déposée est ordinairement liquide. Dans la fermentation principale et dans la secondaire, le n° 2 donne une atténuation plus faible que le n° 1.

Les bières fabriquées dans la même brasserie avec l'une et l'autre de ces espèces de levure diffèrent beaucoup. Au point de vue du goût, la plupart des connaisseurs, donnent la préférence au n° 2; ceci ne se discute pas; en tous cas, le goût diffère de celui du produit du n° 1. Enfin les deux espèces sont très différentes sous le rapport de la résistance contre les troubles occasionnés par la levure. La bière fermentée par le n° 1 est, sous ce rapport, beaucoup plus résistante que celle qui provient du n° 2. Par conséquent le n° 1 convient spécialement à la fabrication des bières de garde et d'exportation, le n° 2 plutôt pour les bières en fûts et de consommation rapide. Ces caractères distinctifs de ces deux espèces sont restés invariables dans le courant des années. (Voir aussi les expériences de M. Borgmann sur l'action chimique des deux espèces, pages 222).

La description que nous venons de donner des rapports microscopiques de ces deux types de levure basse, ne peut, en aucune façon, être interprétée dans ce sens, que l'examen microscopique d'une espèce de levure inconnue peut nous faire reconnaître si celle-ci donnera en pratique une atténuation forte ou faible, une clarification lente ou rapide, etc. Les recherches de Hansen ont au contraire prouvé *qu'il est impossible d'établir par cette voie une règle générale*, attendu que des espèces provoquant une forte atténuation, pourront affecter le même aspect microscopique que d'autres espèces ne donnant lieu qu'à une faible atténuation. On n'aura un véritable point d'appui dans cet ordre de choses que lorsque nos connais-

sances sur la structure du plasma seront beaucoup plus avancées. Toutes les indications de ce genre sur les levures, parues jusqu'à présent dans la littérature, ne sont que des assertions propres à induire en erreur.

Citons comme un bel exemple de l'emploi des méthodes biologiques de *Hansen* pour la différenciation des espèces de levure, la comparaison effectuée par *Will*, de quatre levures basses de brasserie, qui révèle à nouveau, que parmi ce groupe, il existe des espèces distinctes, tout aussi bien que parmi celui des *Saccharomyces* qui n'ont encore trouvé aucune application dans l'industrie. Dans sa caractérisation, *Will* part du groupement provisoire des types de levures des brasserie, établi en 1886, par l'auteur de ce livre, en plaçant les races 93 et 2 dans les types à haute atténuation, la race 7 dans celles à basse atténuation, tandis que la race 6 est une levure de moyenne atténuation. Ces quatre levures peuvent être décrites de la manière suivante :

La race 2 possède de grosses cellules arrondies ou ovales. Sur gélatine, les colonies sont sphériques ou lenticulaires. Les spores se développent facilement et avec abondance. La sporulation se présente entre 31 et 41°; l'optimum est à 25-26°. La formation des voiles a lieu de 31 à 7°; elle est très lente.

Dans la race 6 les cellules ovales prédominent; mais cette espèce a une tendance à former des cellules en boudin. Les colonies sur gélatine sont sphériques ou lenticulaires. Le développement des spores se fait facilement et avec abondance. La sporulation se présente de 31 à 41°; l'optimum est à 28°. La formation des voiles a lieu de 30 à 7°; elle se présente plus tard que chez la race 7.

Les cellules de la race 93 ont la forme ovale typique, mais offrent en général plutôt la forme arrondie. Les colonies sur gélatine sont sphériques ou lenticulaires. La sporulation se montre de 30 à 10°; l'optimum est à 28°. La

formation des voiles, très lente et faible, apparaît de 31 à 4°. Dans le voile les « cellules durables » sont très abondantes :

La race 7 possède des cellules ovales qui se rapprochent beaucoup de la forme sphérique ; des « cellules géantes » apparaissent régulièrement, et, à la fin de la fermentation, des chainons, composés de petites cellules ovales bourgeonnantes, sont fréquents. Sur gélatine, les jeunes colonies sont irrégulières, à bords très sinueux, crénelés. Cette espèce ne forme que très difficilement des spores. La sporulation se présente de 30 à 13°, l'optimum est à 25-26°. La formation des voiles, qui a lieu de 28 à 4°, apparaît plus vite que chez les autres espèces. Les « cellules durables » ne se trouvent qu'en petit nombre dans les voiles.

Une série d'espèces de levures de vin ellipsoïdales a été caractérisée au point de vue morphologique et biologique par Aderhold. Kayser a également décrit un grand nombre de levures de vin de divers pays, ainsi que les espèces qui apparaissent dans la fermentation du cidre.

Un groupement provisoire, fait au point de vue pratique, des différentes espèces ou races de levure de bière de fermentation basse et haute, qui ont été cultivées à l'état pur, dans notre laboratoire, suivant la méthode de Hansen, est celui-ci :

A. — Espèces de fermentation basse.

1. Produisant une clarification très rapide et une atténuation faible ; bière tenant bien la mousse. Pour une conservation de longue durée, celle-ci n'offre point de résistance contre le trouble par la levure. De telles levures

ne conviennent guère que pour des bières en fûts (bières jeunes).

2. Produisant une clarification assez rapide et atténuant faiblement ; bière tenant bien la mousse ; mousse frisée haute pendant la fermentation ; la levure forme un dépôt très consistant au fond de la cuve. La bière n'est pas particulièrement résistante contre le trouble par la levure. Convient pour les bières en fûts et en partie pour les bières de garde.

3. Levures produisant une clarification lente et une forte atténuation. La bière est très réfractaire au trouble par la levure. Ces levures conviennent à la fabrication des bières de garde et surtout à celles d'exportation.

B. — *Espèces de fermentation haute.*

1. Atténuant faiblement, clarifiant rapidement. La bière est douce au goût.

2. Atténuant fortement, clarifiant vite. Goût plus prononcé.

3. Atténuant fortement, clarifiant plus lentement. La bière est très réfractaire au trouble par la levure.

La majeure partie des levures hautes examinées à ce point de vue, peut effectuer une fermentation secondaire. Dans les groupes 2 et surtout 3, cette fermentation secondaire est très énergique et de longue durée.

Comme résultat très essentiel des expériences pratiques, il faut faire ressortir le fait, qui contribue à un haut degré à faire valoir la portée des caractères spécifi-

ques des *Saccharomyces* soumis à la culture, savoir que le groupement que nous venons d'établir est valable d'une manière générale, même dans les conditions pratiques les plus différentes, telles qu'elles peuvent se présenter dans des pays très éloignés l'un de l'autre. Ainsi la race de Carlsberg n° 1 produit partout une bière très particulièrement résistante contre le trouble par la levure. D'autres espèces, qui produisent une clarification plus rapide de la bière, ont aussi fait preuve de cette propriété partout dans des conditions de fabrication normales. C'est là le résultat principal des longs travaux de l'auteur de ce livre, qui ont permis de rassembler des notions, puisées dans les conditions les plus variées, dans tous les pays producteurs de bière.

Encore un exemple de cette ténacité des propriétés spécifiques, dans des conditions extérieures très différentes, nous a été fourni par Irmisch dans une étude expérimentale comparée sur deux espèces de levures basses. Une de ces espèces atténuait faiblement et ne se multipliait que très peu dans le moût, l'autre produisait par contre une forte atténuation et avait une vigoureuse puissance de reproduction. La marche de la fermentation était toute différente d'une espèce à l'autre. Cette différence resta invariable même pour les degrés différents de concentration du moût primitif, pour des quantités variables de la levure d'ensemencement, pour des températures très différentes. Cette différence subsista aussi lorsqu'on fit emploi de cultures développées préalablement dans du moût diatassé, et encore en opérant dans des conditions d'aération très différentes sur du moût ordinaire ou sur un moût rendu très pauvre en maltose par un traitement spécial, ou bien enfin en présence des drèches pendant la fermentation et dans des solutions de sucre de canne. Même pour des fermentations qui avaient duré plus de six mois, l'examen du produit final démon-

tra, que les différences typiques des deux espèces ne s'étaient pas effacées.

On emploie des races particulières dans la *distillerie* et dans la *fabrication de la levure*. Depuis 1887 une série de levures de distillerie, de levures pour la fermentation de la mélasse et la fabrication de la levure pressée furent obtenues à l'état de pureté absolue dans le laboratoire de l'auteur. Elles offrirent, tant dans les formes du dépôt que dans la formation des ascospores, de grandes différences. Les espèces qui ont été introduites dans l'industrie ont aussi, sous ce rapport, fait preuve de propriétés différentes constantes. Les mêmes observations ont été faites plus tard par *Delbrück*, *P. Lindner*, *Stenglein* et d'autres chercheurs.

Suivant les observations de l'auteur de ce livre, on peut aussi établir pour ces espèces de levure une différenciation de groupes. Des différences apparaissent déjà dans l'aspect de la fermentation, attendu que quelques espèces donnent des signes manifestes de *fermentation haute*, tandis que dans des essais parallèles, d'autres se comportent comme *levures basses*. De plus, la différence paraît aussi dans la *faculté de reproduction* des cellules et dans le *rendement en alcool*, toutes choses égales d'ailleurs. Enfin les espèces accusent une différence évidente dans l'action qu'elles exercent dans les divers liquides nourriciers si variés (mouls d'orge, de seigle, de maïs, de pommes de terre, de mélasse, etc.), employés dans cette branche de l'industrie. Il faut donc toujours choisir des races conformes aux conditions données.

La composition du *distillat* montre de très grandes différences, comme il ressort entre autres des recherches détaillées, de *Raymann* et *Kruis*.

Des recherches de l'auteur de ce livre ont fait ressortir une intéressante différence morphologique entre les espèces utilisées dans l'industrie, à savoir, qu'elles se divisent

en deux groupes, dont l'un (A) se présente en *petits amas de cellules beourgeonnantes*, vu la rapidité avec laquelle les bourgeons se détachent de la cellule-mère, tandis que l'autre (B) apparaît en *gros chaînons de bourgeons multicellulaires*. Cette différence typique s'est invariablement maintenue dans des espèces, qui avaient été cultivées à l'état de pureté et utilisées en pratique depuis dix ans. Il n'existe aucun rapport direct entre ces conditions morphologiques et le signe extérieur de la fermentation (fermentation haute ou fermentation basse).

Bêlohoubek, *Schumacher* et *Wiesner* ont aussi effectué des analyses microscopiques et chimiques de levures de ce genre, et en particulier l'ouvrage de *Bêlohoubek* « *Studien über Presshefe* » (Prague, 1876) contient des descriptions exactes de l'aspect microscopique de la levure pressée dans les différentes phases de son développement, et des données sur le critérium microscopique de la qualité de la levure fabriquée, autant qu'il est possible d'en juger par le contenu des cellules. Les cellules de levure en décomposition modifient la couleur et la consistance du plasma. Celui-ci devient peu à peu plus foncé, fluide, les vacuoles grandissent, les limites nettement accusées entre les vacuoles et le plasma disparaissent peu à peu ; ce dernier se retire de la paroi cellulaire et finit par se réunir pour former des masses irrégulières dans le liquide cellulaire ; ce liquide cellulaire disparaît également, et enfin la paroi se dissout. En outre, il se présente dans la levure pressée, suivant les auteurs mentionnés, des cellules dans lesquelles apparaissent subitement un assez grand nombre de *petites vacuoles* ; ces « cellules anormalement vacuolisées » périssent rapidement.

AUTRES CHAMPIGNONS BOURGEONNANTS.

(*Torula*, *Saccharomyces apiculatus*, *Mycoderma cerevisiæ* et vini)

Comme appendice, nous donnons un aperçu de certains champignons ayant plus ou moins d'importance dans l'industrie de la fermentation, et qui ont ceci de commun avec les *Saccharomyces*, qu'ils se reproduisent par bourgeonnement ; ce n'est qu'exceptionnellement que nous rencontrons un mycélium parmi ces espèces. Ils se distinguent par contre des *Saccharomyces*, en ce que la formation des spores endogènes qui caractérisent ceux-là, fait ici tout à fait défaut.

A vrai dire, les formes étudiées par Hansen, qui forment un mycélium, devraient être classées parmi les moisissures. Cependant, comme la classe des moisissures à laquelle elles appartiennent, n'a pas encore été systématifiée, ces espèces trouveront leur place, pour des raisons pratiques, dans le présent chapitre.

Torula. Hansen.

Ces formes, ressemblant à des levures, ont d'abord été caractérisées par *Hansen*. Elles sont très répandues et ne sont par conséquent pas rares à trouver dans des analyses physiologiques de la levure. Elles affectent tant la forme sphérique que la forme plus ou moins allon-

gée, et se distinguent du genre *Saccharomyces*, comme *Hansen* l'a indiqué le premier, en ce qu'elles ne peuvent pas former de spores dans leur intérieur. Elles se multiplient dans la plupart des cas par bourgeonnement, dans un petit nombre de cas isolés en même temps par la formation d'un mycélium.

Des recherches de l'auteur ont démontré que certaines formes de *Torula* peuvent agir comme *lecures de maladie*, vu qu'elles peuvent pulluler et provoquer des troubles dans des bières de fermentation haute peu atténuées quand celles-ci sont soutirées en bouteilles. Toutefois, ce trouble diffère quelque peu de celui que produisent dans les bières basses les *Saccharomyces* sauvages.

Suivant d'autres recherches de l'auteur, les formes de *Torula* sont très répandues dans les raffineries où elles se trouvent souvent en quantités considérables dans le sucre terminé. Un grand nombre des espèces étudiées possédaient un enzyme intervertissant. Il se peut que ces végétations jouent un rôle dans la formation progressive du sucre interverti qui se produit quelquefois pendant l'emmagasinage du sucre de canne.

Hansen en a observé un grand nombre d'espèces différentes, et nous a donné une description exacte des suivantes.

La première apparaît dans le moût soit isolée, soit en colonies, se composant d'un petit nombre de cellules. Quelques-unes de ces dernières ont à leur centre une grande vacuole, parfois avec une granulation très réfringente. La grandeur des cellules est très variable ($1\frac{1}{2}$ - $4\frac{1}{2}$ μ). Cette espèce ne sécrète pas d'invertine et produit dans le moût de bière une fermentation alcoolique à peine perceptible.

La deuxième espèce a, dans les mêmes conditions, des cellules plus grandes que la première (de 3 à 8 μ); elle ressemble à la précédente, seulement les cellules ont

souvent, lorsqu'elles sont cultivées dans du moût, un contenu très granuleux.

La *troisième espèce* qui, vue au microscope, a le même aspect que la seconde, produit dans les mêmes conditions jusqu'à 7/8 0/0 d'alcool en volume: elle forme une mousse abondante et occasionne un fort dégagement d'acide carbonique; elle ne peut cependant pas transformer la saccharose.

La *quatrième espèce* (2-6 μ) peut transformer la saccharose et produit dans du moût, avec formation abondante de mousse, un peu plus de 1 0/0 d'alcool en volume, mais elle ne fait pas fermenter la maltose.

La *cinquième espèce*, qui ressemble à la première (en ce qui concerne la forme et les dimensions des cellules), développe, à la température ordinaire de la chambre, un voile homogène, gris mat, sur le moût et sur l'eau de levure, ainsi que sur de la bière de garde, et même sur des liquides contenant jusqu'à 10 0/0 d'alcool. Elle intervertit la saccharose et, dans de tels liquides, elle donne naissance à un faible voile. Par contre elle ne provoque pas de fermentation alcoolique appréciable.

Une *sixième espèce* (Fig. 71), qui possède des cellules

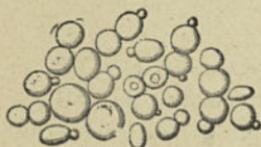


FIG. 71

Torula, d'après Hansen

Levure déposée après un jour de culture dans du moût à 25° C.

sphériques et ovales, produit dans du moût de bière une fermentation manifeste et jusqu'à 1,3 0/0 d'alcool en volume. Elle ne provoque aucune fermentation dans des solutions de maltose. Elle intervertit la saccharose et fournit 3,1 et 6,2 0/0 d'alcool en volume dans des solutions de ce sucre, de 10 et

15 0/0 dans de l'eau de levure, après 15 jours de culture à 25° C.; cette dernière culture donna, au bout de deux mois, 7 0/0 d'alcool en volume. Des solutions de dextrose

de la même concentration donnèrent dans des conditions analogues 6,6 et 8,5 0/0 d'alcool en volume.

La septième espèce (Fig. 72 et 73) a été trouvée dans le sol au pied des ceps de vigne. Les cellules de la levure

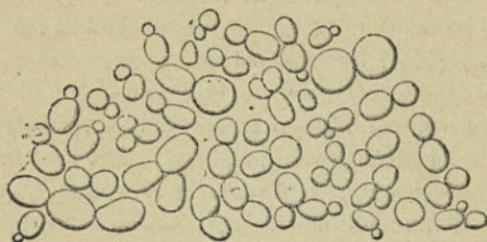


FIG. 72.

Torula, d'après Hansen

Levure déposée après une culture d'un jour dans du moût à 25° C.

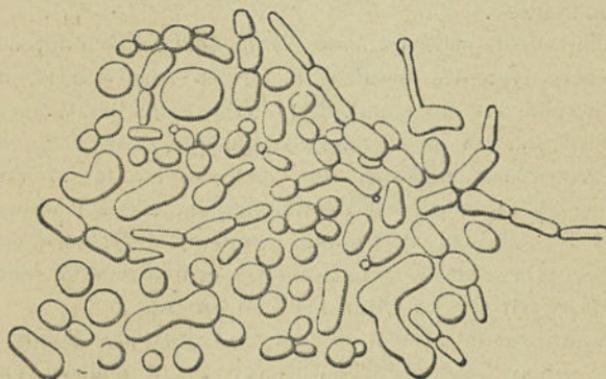


FIG. 73.

Torula, d'après Hansen (la même espèce que dans fig. 72)

Formation de voiles dans une culture de 10 mois dans du moût.

déposée sont le plus souvent ovales et en partie plus grandes que celles de l'espèce précédente. Les cellules des voiles ont quelquefois des formes très irrégulières. Cette *torula* ne donne dans le moût que 1 0/0 d'alcool en

volume, ne donne lieu à aucune fermentation dans de la maltose, pas plus que dans de la saccharose, qu'elle est incapable d'intervertir. Cultivée dans des solutions de dextrose dans de l'eau de levure à 10 et 15 0/0, elle produit, au bout de 15 jours, à 25° C., 4,6 et 4,5 0/0 d'alcool en volume. Au bout de 28 jours, les deux cultures contenaient 4,8 et 4,7 0/0 d'alcool en volume. Deux autres cultures donnèrent, après un long repos 4,8 et 3,3 0/0 d'alcool en volume. *Hansen* admet que cette espèce participe à la fermentation du vin, et qu'il est probable que des espèces telles que la sixième et la septième, qui produisent une fermentation énergique dans une solution de dextrose, jouent aussi un rôle dans la fermentation du vin et dans celle des cidres. Elles n'ont par contre probablement que peu d'importance pour les brasseries et distilleries, attendu qu'elles ne peuvent pas faire fermenter la maltose.

Une autre espèce *Torula Novæ Carlsbergiæ*, qui se présente avec des cellules de formes très variées, a été décrite par Grönlund. Elle donne à du moût, dans des ballons, un goût désagréablement amer. D'après les recherches de *Schjerning*, cette espèce intervertit le sucre de canne et provoque une fermentation alcoolique dans des solutions de sucre de canne, de dextrose et de maltose. Dans du moût de brasserie ordinaire, elle peut produire environ 4,7 0/0 d'alcool en volume.

Ces espèces de *Torula*, qui ne possèdent pas d'invertine, qui ne produisent qu'environ 1 0/0 d'alcool en volume dans des cultures dans du moût de bière, et qui ne peuvent par conséquent pas faire fermenter la maltose, sont très répandues dans la nature. Autant que les recherches permettent de juger, ces espèces provoquent une fermentation dans des solutions de dextrose.

Aux formes sus-mentionnées se rattachent le plus

intimement les *champignons bourgeonnants colorés en rouge* (la *levure rosée* de la bactériologie médicale), qui sont généralement répandus dans la poussière de l'air. On en connaît plusieurs espèces, ainsi *Kramer* trouva dans le cidre, une levure *Torula* de fermentation haute, qui produit une matière colorante rouge, soluble dans l'eau. Elle fait fermenter la dextrose, et dans une solution à 10 0/0 elle produit 4,5 0/0 d'alcool en volume. Elle intervertit la saccharose et fait fermenter directement la maltose. Elle n'a aucune action sur la lactose.

Ces différentes espèces ne peuvent pas être distinguées rien qu'au microscope, pas même des cellules rondes des diverses espèces de *Saccharomyces*. Suivant les recherches indiquées plus haut, il existe parmi celles-ci, des espèces ayant une activité fermentative très prononcée.

Hansen admet avec quelque chance de probabilité, qu'elles dérivent de champignons d'un ordre plus élevé, et il a en effet, dans ses essais de culture, observé la formation d'un mycélium dans quelque cas.

Levures *Torula* faisant fermenter la lactose.

Duclaux a trouvé dans le lait un champignon qui produit dans une solution de lactose une fermentation alcoolique. Ce champignon semble se rapprocher le plus du groupe des *Torulas*. Les cellules ont de 1,5 à 2,5 μ et sont presque sphériques. Suivant les essais de *Duclaux*, cette levure est plus aérobie que les levures alcooliques ordinaires. Malgré une forte aération du liquide, toute la lactose est absorbée pour la fermentation alcoolique. Dans une solution de lactose à 5 0/0, il se produit au bout de 11 jours de fermentation à 25° C, 2,5 0/0 d'al-

cool. Dans un liquide neutre, la température de fermentation la plus favorable se trouve entre 25 et 32° C.; de 37 à 40° C. la fermentation cesse. De faibles quantités d'acides entravent l'activité fermentative de cette levure.

Adametz donne également la description d'un champignon bourgeonnant qui fait fermenter la lactose (*Saccharomyces lactis*). Comme dans les cultures faites d'après la méthode de Hansen, ce champignon ne développe pas de spores endogènes, nous le rangeons également dans le groupe des *non-Saccharomyces*. Les cellules qui ont à peu près les mêmes dimensions que celles du *Saccharomyces cerevisiae* sont rondes ou ellipsoïdales. Sur de la gélatine peptonisée, les colonies sont rondes, aux limites faiblement sinueuses, et de couleur brun foncé. La culture par piqûre dans du moût gélatiné fait voir à la surface une petite élévation plate et mate, ainsi qu'une végétation très forte dans le canal d'inoculation, duquel partent de nombreux rayons qui vont se perdre dans la gélatine. Dans du lait stérilisé, le champignon présente à 30° C., déjà dans l'espace de 24 heures, les phénomènes de la fermentation, à 38° C. au bout de 48 heures, à 25° C. au bout d'environ 4 jours. Dans cette fermentation, il n'y a que la lactose qui se décompose.

Ces deux dernières espèces furent étudiées d'une manière plus approfondie par Kayser, ainsi qu'une nouvelle espèce, qui fait aussi fermenter la lactose et qui appartient également aux *non-Saccharomyces*. Toutes les trois forment sur la gélatine des colonies plus étendues que celles des levures de vin et de bière; au centre de la colonie, se trouve une partie plus épaisse, le bord de la colonie est en forme de mycélium. Quand l'air a suffisamment accès, elles produisent dans le lait et dans des liquides neutres, de 25 à 30° C., une fermentation appréciable. Pendant la fermentation alcoolique, le lait ne devient pas visqueux et ne se coagule pas. Les

trois espèces font fermenter la lactose, la galactose, la saccharose, la glucose, le sucre interverti et enfin la maltose, mais cette dernière avec beaucoup de peine. La fermentation de la lactose par ces espèces, produit des liquides aussi riches en alcool que les bières les plus fortes. Kayser fait remarquer qu'il sera peut-être possible d'utiliser cette observation en pratique, car on peut, par l'intermédiaire de ces espèces de champignons, transformer en un liquide spiritueux les grandes masses de petit-lait, qui proviennent de la fabrication du fromage.

Deux espèces de levure faisant également fermenter la lactose, et qui sont aussi à considérer provisoirement comme des *non-Saccharomyces*, ont été décrites par Beyerinck. Ce sont le « *Saccharomyces Képhir* » trouvé dans les grains de képhir, qui se compose de cellules allongées, de formes différentes, développant sur de la gélatine nutritive des colonies quelque peu sinueuses, qui liquéfient la gélatine et le « *Saccharomyces tyrocola* », dont les cellules sont petites, arrondies, et qui donne sur de la gélatine des colonies d'un blanc de neige. Suivant Beyerinck, ces deux espèces secrétaient un ferment intervertissant particulier (*la lactase*), qui transforme non-seulement le sucre de canne, mais encore la lactose, par contre, ce ferment n'intervertit pas la maltose. On peut préparer la lactase en ajoutant à une solution de lactose à 50/0, des sels nutritifs et de l'asparagine, puis en la faisant fermenter au moyen de la levure de képhir, et en précipitant avec de l'alcool le ferment dans le liquide fermenté filtré. Schuurmans-Stekhoven trouva cependant que le ferment de la levure de képhir de Beyerinck n'intervertit pas la lactose.

Bohiccio a trouvé dans du fromage lombard une levure haute avec bourgeonnement unilatéral, appelée *Lactomyces inflans caseigrana*. Elle fait fortement gonfler les parties superficielles du fromage durci. La végétation

consiste en cellules allongées, rondes ou ellipsoïdales; elle forme sur gélatine des colonies blanchâtres à bords unis. On n'a pas observé de sporulation. Ce champignon coagule le lait stérilisé et liquéfie en partie le coagulum sans formation distincte d'acide. Dans du bouillon de lactose, il provoque, entre 25° et 40° C., une fermentation énergique; la température la plus favorable à son développement est située près de 30°, la température limite aux environs de 60°. Le petit-lait infecté par ce champignon est transformé en une boisson mousseuse, dont le goût n'est pas désagréable.

Saccharomyces apiculatus. Reess

(Fig. 74)

Comme on l'a déjà fait remarquer, le nom de ce champignon n'est pas correct d'après la manière actuelle d'envisager ces questions, car on ne peut ranger parmi les *Saccharomyces* que les levures qui développent des spores endogènes. Or, le champignon qui nous occupe n'est pas de ce nombre. Conformément à *Hansen*, nous voulons conserver provisoirement l'ancien nom générique, jusqu'à ce que l'on ait une classification plus exacte du système.

On sait que ce champignon donna lieu à une des études biologiques les plus belles et les plus complètes de *Hansen*, qui arriva, par des recherches poursuivies pendant plusieurs années, à établir ses habitats dans la nature, ainsi que ses migrations régulières pendant les différentes saisons de l'année. La raison qui avait fait choisir cette espèce comme objet de recherches exactes est que, contrairement aux autres espèces qui affectent des formes

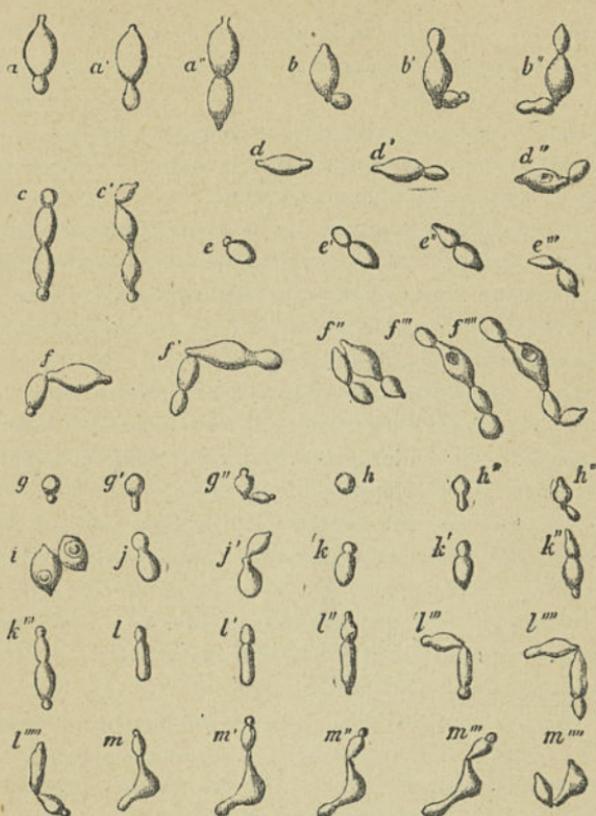


FIG. 74.

Saccharomyces apiculatus, d'après Hansen

Cellules bourgeonnantes. **a-a''** une cellule qui, à son extrémité inférieure, pousse un bourgeon dans l'espace de 3 1/4 heures; **b-b''** une série de développement analogue, où le bourgeon se développe à l'extrémité supérieure de la cellule-mère, tandis que déjà précédemment un bourgeon s'était séparé de l'extrémité opposée; **c** représente une série de cellules; **c'** la même 3/4 d'heure plus tard; le bourgeon inférieur avait atteint, comme les cellules superposées, la forme typique de l'espèce, mais dans la figure, elle est vue par l'extrémité, de sorte que l'axe longitudinal est perpendiculaire au papier; **d-d''** développement en 1 1/4 heures; **e-e'''** en 2 1/4 heures; **f-f'''** en 3 heures. On voit dans **e-f** que les cellules ovales forment d'abord un bourgeon et ne prennent que plus tard la forme typique d'un citron. **g-m** cellules anormales et séries de développement.

excessivement variées et indéterminées, ce qui rend l'étude de leur apparition en divers lieux très sujette à caution, ce champignon-ci peut toujours être reconnu avec certitude à sa forme, attendu que dans les cultures, il se présente toujours avec des cellules en forme de citron. C'est là la forme typique de l'espèce.

On trouve ce champignon en quantité abondante dans la levure de vin, surtout dans les premières phases de la fermentation, ainsi que dans les bières belges à fermentation spontanée; dans la nature on le trouve en abondance sur des fruits mûrs, doux et juteux.

On peut suivre son développement en portant une parcelle d'une pareille végétation dans une goutte de liquide nourricier sous le microscope. Comme *Hansen* l'a indiqué le premier, ce développement est très bizarre (*c, f*, Fig. 74). On voit que les bourgeons provenant des cellules typiques en forme de citron peuvent également affecter la forme d'un citron (*a, b, c, e, f*), ou devenir ovales (*a-c*); on remarque aussi que les cellules ovales sont obligées de former un ou plusieurs bourgeons avant de pouvoir prendre la forme d'un citron (*e-f*), et enfin que la forme de citron qu'une cellule a acquise par bourgeonnement (*k, k', k''*), peut de nouveau disparaître pendant le prochain bourgeonnement (*k'''*). Dans d'autres circonstances, les cellules peuvent prendre des formes entièrement différentes: la forme allongée, celle d'une demi-lune, l'aspect de bactéries, etc. (*g-m*). Existe-t-il une règle dans cette confusion apparente des formes? Dans ce qui précède, on a vu que le champignon pouvait détacher deux espèces de bourgeons, et que les bourgeons ovales sont obligés de détacher un ou plusieurs nouveaux bourgeons avant de prendre la forme typique. La question est alors celle-ci: dans quelles conditions les deux espèces de bourgeons se développent-elles? Des essais de culture ont établi que les bourgeons en forme de citron se développent principa-

lement dans les premières phases de la culture, et que plus tard ils font de nouveau place à ceux aux formes ovales.

Nous allons donner une description plus détaillée de ce champignon au point de vue physiologique et biologique.

Le *Saccharomyces apiculatus* est une forme de fermentation basse pouvant produire de l'alcool dans le moût de bière; la fermentation est cependant faible dans ce liquide; attendu qu'il ne produit que 1 0/0 d'alcool en volume, tandis que dans les mêmes conditions, le *Saccharomyces cerevisiæ* (levure basse) en fournit jusqu'à 6 0/0 en volume. Ceci provient de ce que le champignon n'est pas capable de faire fermenter la maltose. Hansen découvrit de plus la propriété du *Saccharomyces apiculatus*, de ne pas sécréter d'invertine. Dans des solutions à 15 et à 10 0/0 de dextrose dans de l'eau de levure, il engendre par contre une fermentation énergique, et dans le cours d'une expérience, il produisit jusqu'à 3 0/0 d'alcool en volume. Au bout de trois mois, la réaction sur le sucre se faisait encore avec succès, tandis que la quantité d'alcool n'avait pas augmenté dans les six dernières semaines. Le champignon était donc incapable d'achever la fermentation. Dans une autre expérience de Hansen, il se produisit jusqu'à 4,3 0/0 d'alcool en volume.

Des expériences dans lesquelles ce champignon fut cultivé dans du moût de bière après avoir été mélangé avec le *Saccharomyces cerevisiæ*, démontrèrent que tout en étant à titre de plus faible, refoulé par ce dernier, il n'en entravait pas moins sensiblement le développement de la levure de culture.

Dans des ballons avec du moût identique, exposés à la même température et contenant chacun une seule des deux espèces, le *Saccharomyces apiculatus* se sera, au bout du même temps, multiplié plus fortement que le *Saccharomyces cerevisiæ*.

En tant que ce champignon, à l'époque critique de l'année, apparaît en assez grande quantité dans le moût, il peut subsister à côté du *Saccharomyces cerevisiae* pendant un temps assez long et en entraver quelque peu le développement; mais lorsque la bière est amenée dans la cave de garde, le champignon reste inactif dans le liquide alcoolique, et souvent il y périt.

Suivant *Will*, on rencontre très fréquemment dans de la levure de bière basse, des faibles traces de ce champignon dont le développement peut être activé par un traitement à l'acide tartrique. Le même auteur a observé des différences dans les cultures pures des levures apiculées, en tant que quelques-unes d'entre elles produisent dans le moût un bouquet très prononcé rappelant l'éther amylique, tandis que d'autres dégagent une odeur étrange de moisi.

D'après les recherches de *Müller-Thurgau* et de *Wortmann*, ce champignon est à considérer comme dangereux pour le vin, vu que non seulement il nuit directement à la bonne qualité du vin et du cidre, mais qu'entravant aussi la fermentation, il provoque ainsi des maladies dans le vin.

Les parties les plus intéressantes de la vie de ce champignon sont les *conditions*, également mises en lumière par *Hansen*, dans lesquelles il vit à l'état de liberté dans la nature. Des recherches microscopiques et des essais de culture démontrèrent que, dans le courant de l'été, le champignon se trouve en abondance sur les fruits doux et juteux (cerises, groseilles, fraises, raisins, prunes, etc.) lorsque ceux-ci sont arrivés à l'état de maturité. Par contre, on ne l'a trouvé que rarement et exceptionnellement sur les mêmes fruits, lorsqu'ils étaient encore verts. Comme on le trouve sur les fruits mûrs indiqués à l'état de bourgeonnement énergétique, et qu'on ne le rencontre jamais ou qu'exceptionnellement sur d'autres fruits, sur

des feuilles, sur des branches, etc., il est donc prouvé que c'est sur des fruits mûrs de ce genre que se trouve son véritable foyer de développement. Ceci ressort aussi du fait que toujours, et sans exception, on l'a trouvé dans la terre immédiatement sous les cerisiers, les pruniers, la vigne et les autres plantes portant les fruits sur lesquels il avait son siège, et que ce n'est que très rarement qu'on l'a vu dans les nombreux échantillons de terre recueillis dans divers autres endroits. Les fruits qui tombent des arbres et la pluie amènent le champignon à la surface de la terre d'où il pénètre à son intérieur, et la question qui se pose désormais est de savoir s'il peut aussi hiverner dans ce nouveau milieu. La réponse a été obtenue par deux voies différentes, soit en portant, pendant l'hiver et au printemps, de nombreux échantillons de terre pris dans ces endroits, dans des ballons contenant du moût — où ils provoquèrent presque toujours une végétation abondante du champignon qui nous occupe — soit en introduisant avec toutes sortes de précautions, une culture du *Saccharomyces apiculatus* dans la terre, et en l'abandonnant à elle-même pendant l'hiver. Au printemps et au commencement de l'été, on examinait cette terre, et les essais de culture démontrèrent, que dans toutes les épreuves, le champignon avait survécu. Il a été prouvé ainsi que le champignon *peut* hiverner dans la terre, et comme il a été montré précédemment, qu'en réalité il ne peut se trouver uniquement que dans la terre des endroits indiqués. Dans des expériences ultérieures de *Hansen*, on avait introduit de fortes végétations de ce champignon dans des bougies Chamberland bien closes, à fleur de terre. Au bout de trois ans, on porta le contenu de ces bougies dans du moût stérilisé, et il s'y développa une végétation abondante de ce champignon. L'évolution peut donc durer plus d'une année.

Enfin il restait encore à prouver que la terre est son

véritable habitat d'hiver ; c'est ce que fit Hansen en analysant, de janvier à juin, la poussière recueillie dans les endroits les plus divers, beaucoup de fruits desséchés tombés à terre, et enfin divers excréments. Les 71 analyses ainsi obtenues donnèrent un résultat négatif, et par là la preuve était fournie que : *le véritable habitat d'hiver du champignon est la terre, au pied des plantes mentionnées.* Il conserve son aspect ordinaire durant les longs mois d'hiver, et il est de nouveau ramené dans l'air en été par les forces réunies des insectes et du vent, qui le colportent de fruit en fruit.

Il est évident qu'à l'époque à laquelle ce champignon se trouve en quantité abondante sur les fruits mûrs susmentionnés, il peut également être déposé par l'air en d'autres endroits, par exemple sur des fruits verts. Déjà, dans son premier mémoire, Hansen avait indiqué que *la rareté de la présence de ce champignon sur des fruits verts était due à ce que sur ceux-ci il périssait rapidement, soit à cause du manque de nourriture, soit à cause du dessèchement de ses cellules.* Plus tard, il a prouvé par des expériences, l'exactitude de cette supposition. Il répartit dans de l'eau des cellules jeunes et vieilles et les porta en couches minces, soit sur des porte-objets, soit sur du coton étiré en houppes fines, après quoi il les laissa sécher à l'abri des rayons du soleil. En moins de 24 heures, toutes les cellules étaient mortes. Il est évident que les cellules qui se trouvent isolées sur des fruits encore verts, se trouvent dans des conditions encore plus défavorables que dans l'expérience. Si, par contre, on enveloppe les cellules dans des couches plus épaisses de ouate ou de papier à filtrer, elles restent en vie beaucoup plus longtemps, comme dans la terre, par exemple plus de huit mois dans du papier à filtrer.

Il n'existe pas encore d'études approfondies sur l'évolution d'autres ferments alcooliques. *On trouve d'une ma-*

nière très générale des *Saccharomyces* sur les fruits qui fournissent un jus doux. Hansen poursuit pendant plusieurs années des études analogues à celles que nous venons de décrire, exécutées sur des *Saccharomyces* que l'on rencontre fréquemment dans les jardins fruitiers, tels que le *Saccharomyces pastorianus* I, le *Saccharomyces ellipsoideus* I, puis sur la levure basse de Carlsberg n° 1, et sur quelques levures hautes. Il trouva toujours que, semés dans la terre au mois de septembre, ils étaient encore vivants au bout d'un an. Quelques espèces avaient formé des spores à la surface de la terre. Les levures de vin appartenant au groupe *Sacch. ellipsoideus* étaient restées en vie pendant plus de trois ans dans la terre. Ainsi il est prouvé que ces champignons peuvent aussi passer l'hiver en terre. Il n'a pas encore été établi si c'est là leur seul mode de circulation dans la nature.

Contrairement à ces observations immédiates, faites par Hansen, il y a l'opinion de Pasteur, qui dit que les levures de vin ne peuvent pas rester en vie dans la terre pendant la période s'écoulant d'une saison à l'autre. Pasteur, toutefois, n'était pas à même d'indiquer la provenance des levures que l'on trouve sur les raisins à l'époque de la maturité des fruits. Müller-Thurgau obtint le même résultat que Hansen.

Mycoderma cerevisiæ et vini.

Une particularité de ces espèces est qu'elles forment très facilement un voile sur différents liquides alcooliques. Les noms mentionnés embrassent une série d'es-

pièces différentes, dont quelques-unes peuvent engendrer une légère fermentation alcoolique ; elles se comportent de manières différentes dans leur action sur la bière de garde, quelques-unes provoquant des maladies, d'autres n'en provoquant point.

Le *Mycoderma cerevisiæ* (Fig. 75) étudié par Hansen, que



FIG. 75.

Mycoderma cerevisiæ des brasseries de Copenhague, dessiné d'après nature par Holm.

l'on trouve d'une manière générale dans les brasseries de Copenhague, affecte des formes de cellules variées; ces cellules sont ordinairement claires et moins réfringentes que celles des *Saccharomyces* proprement dits ; dans chaque cellule on voit d'habitude 1, 2

ou 3 petits grains très réfringents, qui prennent souvent un mouvement de vacillement et roulement. Ce microorganisme produit sur le mout et sur la bière un voile mat, grisâtre, fréquemment plissé, et n'engendre aucune fermentation alcoolique ; il n'intervertit point des solutions de saccharose.

Sur du mout de bière gélatiné, les taches rompues sont d'un gris clair, mates, étendues en forme de voiles, ou excavées en forme de coupe. Ces caractères microscopiques permettent de distinguer facilement les *Mycoderma* des *Saccharomyces* ordinaires, qui produisent sur le même liquide des taches d'un gris jaune clair à surface sèche ou brillante et aux formes plus ou moins bombées. Il n'y a que le *Saccharomyces membranæfaciens* (page 269), dont

les conditions biologiques sont très anormales et qui produit très rapidement une vigoureuse formation de voile sur le liquide, qui, dans les cultures sur plaques, se comporte essentiellement de la même manière que le *Mycoderma*.

Hansen constata la formation des voiles mentionnés ci-dessus, lorsqu'on abandonne de la bière à elle-même, dans des verres sans couvercles, à des températures entre 2° et 15° C. Les voiles se développaient encore à 33° C., mais aux températures supérieures à 15° C., cette espèce est de plus en plus étouffée par les organismes concurrents. Comme c'est surtout aux basses températures qu'elle trouve des conditions favorables à son développement, elle se propagera facilement dans la cave de garde, d'autant mieux que pour elle la bière est un liquide nourricier bien plus favorable que le moût. Ceci fut le cas lorsqu'on introduisit des parcelles d'un voile pur dans des vases ouverts contenant de la bière et du moût, et que le tout fut abandonné à lui-même ; la culture dans la bière resta presque toujours pure, tandis que plusieurs espèces se présentèrent dans du moût.

Dans les recherches étendues que *Hansen* fit sur la bière de *Carlsberg*, il trouva toujours que ce champignon s'attaque tant à la bière de garde qu'à celle d'exportation ; mais on ne trouva jamais le moindre indice pouvant faire supposer que, pour cette raison, la bière fut atteinte d'une maladie quelconque. C'était précisément aux époques où la bière se distinguait par son inaltérabilité pour la conservation et son bon goût que le champignon était le plus répandu. Cela fut aussi le cas pour les nombreuses recherches faites par *Grönlund* et *A. Petersen*, ainsi que pour celles qui ont été exécutées dans le laboratoire de l'auteur. Il va sans dire, qu'il n'est question ici que de bière soumise à un traitement convenable. Dans des bouteilles et des fûts mal fermés, le *Mycoderma cere-*

visiæ formera naturellement un voile, qui seul suffit déjà pour détruire le produit.

C'est *Bêlohoubek* qui, le premier, a trouvé que dans certains cas, le *Mycoderma* pouvait causer des dommages considérables dans les brasseries. Plus tard, *Kukla* nous a donné la description de troubles particuliers dans la bière de garde, qui se révélaient sous forme d'une fine poussière dans le liquide, soit déjà pendant le repos en cave, soit après le soutirage ; il désigne le *Mycoderma* comme cause de cette maladie, et il admet en outre, que le moût faible à dix degrés (Ball.), ainsi qu'une certaine composition bien déterminée, étaient particulièrement favorables au développement du *Mycoderma*. Il faut espérer que de plus amples recherches jetteront plus de lumière sur ces matières.

Hansen avait déjà précédemment émis l'idée que le nom de *Mycoderma cerevisiæ* ne désigne pas seulement une seule, mais bien plusieurs espèces distinctes. Les recherches faites par *Lasché* confirment cela. Cet auteur nous donne la description de quatre espèces, qu'il a isolées de bières troubles. Elles se distinguent toutes de l'espèce décrites par *Hansen* en ceci que dans du moût de bière elles produisent de l'alcool, l'une 0,26 0/0 en volume, les deux autres 0,79 0/0 et la quatrième 2,51 0/0. De ses essais, *Lasché* conclut que les quatre espèces mentionnées produisent des maladies dans la bière, tant des troubles que des changements de goût et d'arôme ; elles diffèrent donc aussi à ce point de vue-là du *Mycoderma* de *Hansen*. *Lasché* est porté à admettre que la composition chimique du moût n'a aucune influence sur la maladie occasionnée par le *Mycoderma*, vu que dans le cours de ses essais, elle s'était présentée dans toutes sortes de moûts, qu'ils fussent riches ou pauvres en extrait, riches ou pauvres en sucre.

On a prétendu dans la littérature que l'action chimique

de certaines espèces de *Mycoderma* consistait en une fermentation oxydante, qui se produisait à la surface de liquides vineux, et qui transformerait l'alcool dans certains cas en acide carbonique et en eau, dans d'autres cas en acide acétique. Elles seraient aussi capables de produire des acides sébaciques et de les oxyder, et enfin de produire des éthers (*Schulz*) (1).

Dans la lie des foudres d'une brasserie, *Lafar* découvrit un champignon bourgeonnant analogue aux mycodermes avec formation d'acide acétique. Le voile produit par cette espèce, présente l'image typique des formes de croissance correspondantes du *Mycoderma cerevisiæ*.

Dans des recherches faites sur le *Mycoderma* que l'on rencontre sur le vin, *Winogradsky* trouva que dans des cultures pures préparées d'après la méthode de *Hansen*, celui-ci change de forme suivant la composition du liquide nourricier. Il avait fait ses expériences en partie avec des liquides dont les composants minéraux restaient constants, tandis que les matières organiques variaient, en partie, avec des liquides présentant les conditions contraires.

Dans des expériences effectuées avec des cultures pures du *Mycoderma vini* *Wortmann* constata que ce champignon est capable d'altérer le goût du vin, même bien avant d'avoir formé un voile visible ; par contre le bouquet du vin ne perd pas beaucoup dans cette première période de développement.

Quoique de *Seynes*, *Reess*, *Engel* et *Cienkowski* crussent avoir trouvé des ascospores dans le *Mycoderma*, on ne réussit cependant pas plus tard à provoquer ces formations ; les dessins qui existent font supposer qu'on aura pris pour des spores les globules gras que l'on trouve

(1) Ad. Mayer. *Lehrbuch der Gärungschemie*, p. 213, 1879.

dans beaucoup de champignons unicellulaires pendant la période de repos ; dans certains cas, on a apparemment été induit en erreur par le mélange de véritables *Saccharomyces*. L'ancien nom de *Mycoderma* convient donc mieux à ce champignon que le nouveau de *Saccharomyces*.



CHAPITRE VI

APPLICATION PRATIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES RECHERCHES SCIENTIFIQUES.

L'évolution de la fermentation joue un rôle capital dans toutes les branches de l'industrie de la fermentation. Les connaissances pratiques plus étendues, acquises peu à peu dans cette partie de l'exploitation, sont dues au développement de la science qui a pour objet l'étude des organismes de la fermentation. On a fixé ici trois grandes périodes.

Les travaux de la *première* période se rattachent tout à la grande question de savoir si des êtres vivants peuvent naître par *génération spontanée* (*génération spontanea* v. *æquivoca*). La *seconde* période est surtout marquée par les travaux classiques de *Pasteur*. La *troisième* période, qui date de 1879, dans laquelle seulement une réforme a été accomplie, a été créée par *E. Chr. Hansen*.

1. La période la plus ancienne (1743-1857) a fourni la théorie et posé les bases de la technique de la stérilisation et de la désinfection (voir p. 12).

Les découvertes de *Spallanzani* sur la génération spontanée ont non-seulement formé le point de départ de la bactériologie moderne, mais elles ont encore eu une influence magistrale sur la vie pratique. En 1782, *Scheele* fit connaître que, par le chauffage, on pouvait con-

server le vinaigre sans qu'il s'altérât, et *Appert* montra (1810) que la bière, le vin et d'autres liquides pouvaient être rendus propres à la conservation par un traitement analogue. De plus il avait été démontré que l'air pouvait être purifié en étant chassé à travers des tubes rougis (*Schwann*), ou des filtres en coton (*Schröder* et *Dusch*). On avait par là également obtenu le résultat que l'eau pouvait être purifiée par un traitement analogue, pourvu que les filtres fussent suffisamment épais. La base de la théorie de l'emploi des *antiseptiques* fut posée dès 1839 lorsque *Schwann* fit observer que les cellules de levure étaient tuées par certains produits chimiques et qu'en même temps la fermentation pouvait s'arrêter complètement.

2. La période de *Pasteur* commence avec l'année 1857. Le grand mérite de ce savant est d'avoir prouvé que les *bactéries* exercent une action nuisible sur les différentes fermentations, et qu'elles peuvent provoquer des maladies dans les liquides ayant à subir une fermentation alcoolique. On doit donc diriger le travail de telle sorte que des infections de ce genre soient écartées, par exemple en empêchant l'*air impur* d'avoir accès vers les liquides. La conséquence de ce principe est en particulier pour la brasserie, la suppression des bacs et des réfrigérants ouverts, l'aération du moût par de l'air purifié, et la purification de l'air dans les locaux servant à la fermentation.

Dans ce même ordre d'idées, il convient également de citer ces observations relatées dans le chapitre VII des « *Études sur la bière* » (1876), sur l'importance de l'*oxydation du moût* pendant le refroidissement. Par des mesures directes de la quantité d'oxygène contenue dans le moût, *Pasteur* fait voir qu'une certaine quantité d'oxygène, soit libre, soit en combinaison dans le moût, exerce une influence sur la marche de la fermentation et sur la clarification, mais que lorsque la quantité d'oxygène contenue

dans le moût dépasse une certaine limite, cela peut nuire au caractère (force et arôme) de la bière (p. 377).

Malgré les recherches étendues de plusieurs de ses successeurs dans ce domaine, il n'a pas été possible, jusqu'à présent, d'établir des règles définitives d'après lesquelles on puisse travailler dans la pratique. Dans chaque cas particulier, on est obligé de procéder par voie d'expérience.

Pasteur reprit les méthodes de *Scheele* et d'*Appert* pour le traitement du vinaigre, du vin et de la bière, à des températures plus élevées et, grâce à sa grande autorité, il leur assura un champ d'application étendu (la *pasteurisation*). Récemment, surtout depuis que *Koch* a fait voir combien le bacille de la tuberculose est répandu, le lait a également été traité par cette méthode.

Les expériences d'aération décrites dans les « *Études sur la bière* », entraînèrent un grand nombre de recherches qui ont fourni des données précieuses sur la *puissance fermentative et reproductrice* de la cellule de levure, lorsqu'elle est en présence de quantités d'oxygène variables. Ces choses jouent un grand rôle dans la *distillerie* et dans la *fabrication de la levure pressée*. On n'est cependant pas encore fixé sur l'emploi pratique de ce procédé.

La raison pour laquelle le procédé proposé par *Pasteur*, pour la purification de la levure, n'a pas pu acquérir une importance réelle, a été indiquée précédemment (page 35).

3. Avec les travaux de *Hansen* sur les ferments alcooliques, commença, comme *Aubry* le dit avec raison, une nouvelle vie dans l'industrie de la fermentation.

Les premières publications sur ce sujet datent de 1879. En 1883, il démontra que les troubles de la levure, si généralement redoutés, ainsi que les désagréables altérations du goût et de l'arôme, et qu'en général quelques-unes des *maladies de la bière* les plus fréquen-

tes et les plus dangereuses, avaient leur source non pas dans les bactéries, dans l'eau, dans le malt, dans le mode de brassage, etc., comme on le croyait alors, mais bien *dans la levure elle-même*, attendu que dans ces cas, le levain contient, à côté de la race de culture *d'autres espèces de Saccharomyces qui constituent des ferments de maladie* (*Sacch. pastorianus* I et III, *Sacch. ellipsoideus* III). Ceci établit la base du nouveau système.

Ensuite il montra que *sous le nom de Saccharomyces cerevisiæ, on devait comprendre un grand nombre d'espèces ou de races différentes — tant de fermentation basse que de fermentation haute — pouvant communiquer à la bière des propriétés très différentes.*

Sur ces recherches scientifiques se base, comme conséquence immédiate, le troisième article de son nouveau système : sa méthode pour la *culture pure de la levure*.

S'il était possible de faire disparaître dans une masse de levure impure, les levures sauvages, les bactéries et les moisissures, le but ne serait cependant pas entièrement atteint. *Si une levure purifiée de la sorte contient plusieurs espèces de Saccharomyces cerevisiæ, il résulte de ce qui précède, que l'on travaillera aussi peu sûrement qu'avant la purification, et il faut encore ajouter à cela, qu'un pareil mélange est toujours soumis, pendant les fermentations, à des fluctuations dans les proportions de ses éléments constituants.* De nouvelles recherches de Hansen ont même montré qu'il existe des cas où deux races de levure qui, prises isolément, donnent un produit irréprochable, peuvent, lorsqu'elles sont mélangées, *occasionner des maladies dans la bière.* Hansen en fit l'expérience avec les deux espèces de levure basse de Carlsberg, n° I et n° II (page 291) ; il prit tantôt le n° I comme masse principale du levain en y ajoutant du n° II en plus faible quantité, tantôt

il fit l'inverse. Il arriva, dans tous les cas, que l'espèce intérieure en quantité (soit I, soit II) rendait la bière moins propre à la conservation, en ce qui concerne le trouble de levure que si la fermentation ne résultait que de l'espèce dominante employée seule. L'une ou l'autre de ces espèces, employée dans ces conditions, *avait joué le rôle d'une levure de maladie* (par exemple *Sacch. past.* III. et *Sacch. ellipsoideus* II). On n'obtient vraiment donc, de la *régularité dans la fabrication, qu'en choisissant méthodiquement la race convenable, éliminée de la masse de levure et propagée isolément*. C'est sur ce principe que se base le système de culture pure de *Hansen*, dont il fait l'exposé détaillé dans les « *Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation* ». (Voyez le premier chapitre de ce livre sur les méthodes de culture pure).

Les études méthodiques de *Hansen* sur la *constance des caractères des différentes espèces de levures*, qu'il poursuivit pendant plusieurs années, ont démontré que dans les conditions où elles se trouvent ordinairement dans les brasseries, elles ne manifestent, en général, que des variations insignifiantes qui n'ont aucune importance pratique. Ces résultats ont été confirmés par différents auteurs.

Il réussit par contre, par une action méthodique plus énergique sur les conditions vitales des espèces de levure à *produire des variétés*, qui restèrent constantes à différents degrés, jusqu'à celles qui présentèrent le caractère d'espèces nouvelles. Un résultat de ces travaux de *Hansen* fut la préparation qu'il fit de variétés appropriées des levures industrielles.

Les caractères distinctifs biologiques et physiologiques des espèces ont permis à *Hansen* de trouver en même temps une *méthode d'analyse pratique pour la levure de brasserie*, qui permet de se préserver à temps de l'in-

vasion de levures étrangères. Il a été démontré par ses expériences, faites en grand, que les espèces qui troublent la bière pouvaient se trouver dans le levain, dans la proportion de 1/41, et que la levure (*Sacch. pastorianus* L) qui donne à la bière une odeur désagréable et une mauvaise amertume pouvait atteindre dans le levain la proportion de 1/22, sans exercer une influence préjudiciable, si la fabrication est régulière. Au moyen de la méthode analytique de *Hansen*, on peut (d'après les expériences de *Holm* et *Poulsen*) constater avec certitude la présence d'un mélange de levures sauvages de 1/200 de la masse totale.

Il résulte des nombreuses analyses exécutées d'après cette méthode, que *les signes qu'autrefois l'on considèrait généralement comme caractéristiques pour une fermentation normale, ne suffisent pas pour révéler la présence des ferments de maladie, attendu que la couche qui recouvre le liquide, ainsi que l'atténuation, la cassure et la clarification peuvent être satisfaisantes, malgré que la levure soit fortement infectée par des germes de maladie.*

Il est évident que la question de savoir combien de temps une culture pure pouvait conserver son état de pureté primitif dans la pratique, ne peut être résolue d'une façon générale. *Hansen* a trouvé que les diverses races possèdent des *pouvoirs de résistance différents* à l'égard des infections; et de plus une seule et même race ne pourra pas, pendant le même espace de temps, se conserver pure dans des locaux de fermentation inégaux. Nous savons que la saison joue un rôle, et que les périodes de l'année où les levures sauvages, les bactéries et les moisissures abondent dans l'air, sont surtout dangereuses. On sait que l'infection peut également avoir lieu à d'autres époques de l'année.

Les ustensiles et les bacs refroidisseurs ouverts per-

mettent toujours aux germes de maladie de pénétrer dans l'exploitation ; une autre source d'infection se trouve dans la lie des tonneaux. La manière dont les brasseries et les distilleries s'inoculent sans doute le plus fréquemment les germes de maladie est, sans contredit, l'emprunt de levain à d'autres usines. Partout où un contrôle sévère de la fermentation principale fait défaut, une infection pourra subitement se produire et quelquefois ne se manifester qu'à la fin de la fermentation secondaire. Il est donc évident qu'une brasserie pourra facilement, sans s'en douter même, céder à une autre du levain contaminé. Cette possibilité existe, avec bien des preuves à l'appui, entre autres les nombreuses observations faites à ce sujet au laboratoire de l'auteur. Il est donc nécessaire de faire ressortir, *qu'une sûreté absolue ne pourra être obtenue que par l'introduction de la culture absolument pure*. A ce système se rattache encore le *contrôle biologique* des fermentations, adopté aujourd'hui par toute usine bien dirigée.

L'analyse nous révélera toujours l'infection longtemps avant qu'elle ne soit devenue dangereuse, et l'on sera donc à temps pour introduire une nouvelle culture pure de la même levure. On travaillera naturellement avec une sécurité bien plus grande en employant d'une manière suivie l'appareil à propager la levure, qui est décrit plus loin. Le résultat principal se résume en ceci, *qu'aujourd'hui on ne travaille plus au hasard et que l'on n'est plus forcé d'y abandonner ses fermentations, comme c'était le cas autrefois*.

Comme les différentes races de levure ne sont pas également résistantes contre les germes de maladie concurrents, il est, dans bien des cas, très important de pouvoir introduire, à de courts intervalles, d'assez fortes quantités de levure pure dans l'exploitation, une fois que la race convenable aura été choisie par des essais

méthodiques. On se sert, dans ce but, de *l'appareil à propager la levure*, construit par *Hansen et Kühle*, qui, une fois pourvu d'une culture pure, peut fonctionner sans interruption pendant des années entières. L'appareil (Fig. 76), dont *Hansen* donne dans son livre « *Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation* (contributions à la biologie des microorganismes) » (1) une description détaillée avec la manière de s'en servir, se compose de trois parties principales et de tubes qui les relient les unes aux autres. Nous avons : 1. la partie pour l'aération, qui se compose de la pompe pneumatique (A) et du réservoir à air (B) ; 2. le cylindre à fermentation (C), et 3. le cylindre qui reçoit le moût (D).

L'air, purifié en partie par un avant-filtre, est refoulé dans le réservoir à air, et peut être conduit de là dans le cylindre à moût ou dans celui à fermentation. Dans les deux cas, l'air est conduit par des filtres à coton stérilisés (*g, m*). Le *cylindre à moût* communique directement par une conduite avec une chaudière à cuisson dont il reçoit le moût houblonné bouillant, qui entre alors en contact avec l'air dans le cylindre clos, et qui est refroidi par de l'eau qui coule à l'extérieur sur les parois du cylindre. Ensuite on fait passer ce moût, préparé à recevoir la levure, dans le *cylindre à fermentation*. Celui-ci, comme le cylindre à moût, est construit d'après le même principe que les ballons ordinaires à deux tubulures. Il est muni d'un tube recourbé en deux endroits (*cd*) qui plonge dans un réservoir à eau, d'un tube en verre vertical (*fi*) permettant de mesurer la hauteur du liquide contenu dans le cylindre, d'un agitateur (*bb*)

(1) En français, dans le compte rendu des Meddelels. fra Carlsberg Laborat., Copenhague. En allemand chez Oldenbourg, Munich (Voir la bibliographie).

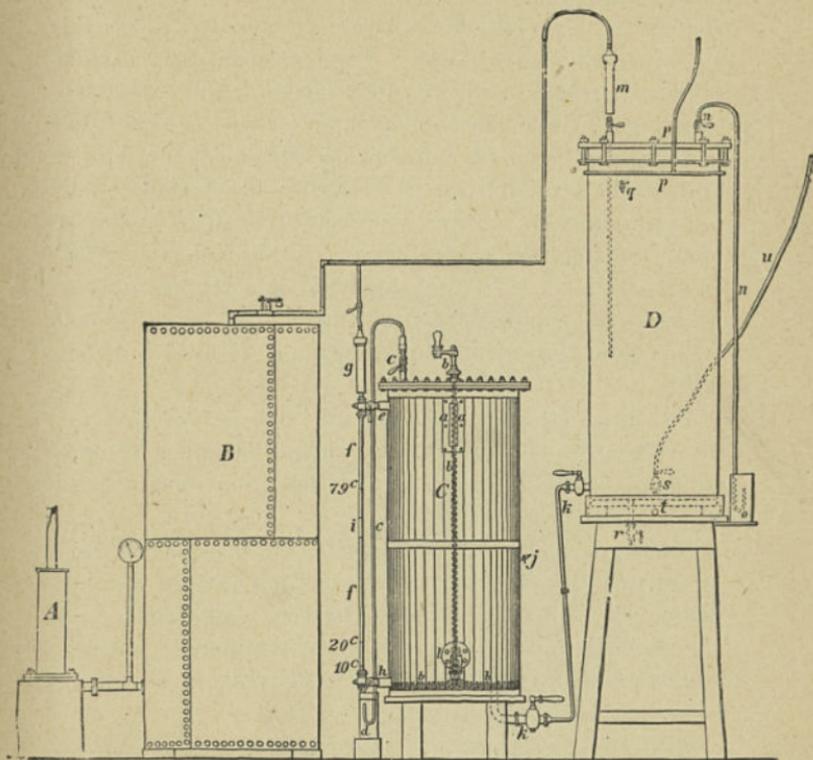


FIG. 76.

Appareil à propager la levure, construit par Hansen et Kühle.

A Pompe à air, **B** réservoir à air, **C** cylindre à fermentation : **a** fenêtre, **bbb** agitateur, **cc** tube recourbé deux fois, **d** vase contenant de l'eau, **l** robinet de soutirage ; **ff** tube en verre relié avec le cylindre par les tubes **e** et **h** et muni de marques pour mesurer des quantités déterminées de liquide, **g** filtre, **i** tube en caoutchouc intercalé dans le milieu du tube en verre, **j** tube servant à introduire la culture pure, **kk** communication avec **D**, le cylindre à moût ; **m** filtre, **nn** tube recourbé deux fois, **o** récipient contenant de l'eau, **pp** tube rafraîchisseur, **u** conduite du moût avec robinet **s**, **t** tube d'écoulement pour l'eau de refroidissement, **q** robinet (on laisse monter le moût jusqu'à ce robinet), **r** robinet de soutirage.

pour mélanger la levure déposée avec le moût, et d'un robinet de sortie (*l*) pour la bière et la levure, construit spécialement dans ce but. Il se trouve, environ au milieu du cylindre, un petit tube latéral (*j*) avec serpentín, pince à vis et bouchon en verre. Quand une partie du moût a pénétré dans le cylindre à fermentation, on introduit par le serpentín en (*j*) la levure absolument pure, qui est expédiée à la brasserie dans un ballon spécialement construit pour cet usage : ensuite on rebouche le serpentín et l'on peut ajouter, immédiatement ou au bout de quelques jours, suivant la quantité de levure que l'on a introduite, ce qu'il reste encore de moût.

Si l'appareil a été placé dans un local où il est nécessaire de régler la température pendant la fermentation, on devra entourer le cylindre à fermentation d'une enveloppe en cuivre.

Ce simple appareil permet de produire, en très peu de temps, de la levure absolument pure pour environ 8 hectolitres de moût. Une fois en marche, l'appareil fonctionne indéfiniment. Nous renvoyons d'ailleurs à la description détaillée qui se trouve dans l'ouvrage de *Hansen*, mentionné plus haut.

Bergh et Joergensen ont apporté une modification de l'appareil propageur (Fig. 77). L'air filtré est amené par les robinets à trois voies, en *A*, *B* et *C*, dans les deux cylindres **A** et **B**. Le cylindre du haut contient environ 30 litres, celui du bas 160 litres. *A* est muni d'un agitateur (*E*) d'un tube (*a*) servant à l'introduction de la levure et au soutirage des échantillons. Le tube recourbé *F* sert de tube d'échappement pour l'acide carbonique. Les deux cylindres sont reliés l'un à l'autre au moyen du tube *GP*. Cette communication peut être établie ou interceptée par le robinet *G*. *H* est l'échappement de l'eau de lavage, lorsque le cylindre *A* a été nettoyé.

Le cylindre *B* est enveloppé d'un manteau en fonte partagé en deux. Au moyen d'eau circulant dans le manteau supérieur, le moût peut être refroidi et la fermentation réglée; le manteau inférieur sert d'enveloppe pour la vapeur, avec un robinet en *O*, pour l'entrée, et un autre en *S* pour la sortie de la vapeur, *M* est un tube en forme d'anneau, muni de petits trous; pendant le refroidissement du moût, il communique avec une conduite d'eau froide. L'eau est soustrée en *N*. L'agitateur *I* est actionné par un système de roues. Un flotteur à aiguille et arc *L* indique la hauteur du liquide dans le cylindre. Du couvercle part le tube recourbé *K*. Le robinet *Q* adopté au fond est en communication avec le tube de conduite *b* (avec le

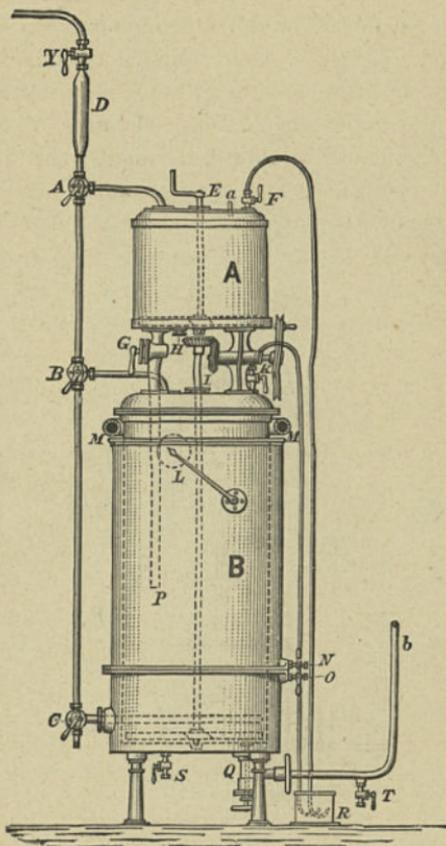


FIG. 77.

Appareil propageur construit par Bergh et Joergensen.

robinet *T*). Les deux tuyaux recourbés aboutissent au récipient *R* qui est rempli d'eau.

Le moût s'introduit dans le cylindre inférieur, où il est traité de la manière ordinaire. La culture pure est mise dans le cylindre supérieur, d'où elle est entraînée par un peu de moût dans le cylindre inférieur, et d'ici on fait passer ce moût dans le cylindre supérieur et ensuite de nouveau dans *B*. Quand il s'est produit dans ce dernier un vigoureux développement de levure, on agite le liquide et on presse une partie du liquide fermentant dans *A*, pour l'utiliser dans la prochaine fermentation. Le cylindre *B* est donc alternativement cylindre à fermentation et cylindre à moût (1).

D'autres modifications ont été apportées par MM. *Brown* et *Morris*, *Elion*, *Kokosinski*, et *van Laer*; les appareils construits par MM. *P. Lindner* et *Marx* diffèrent davantage (2).

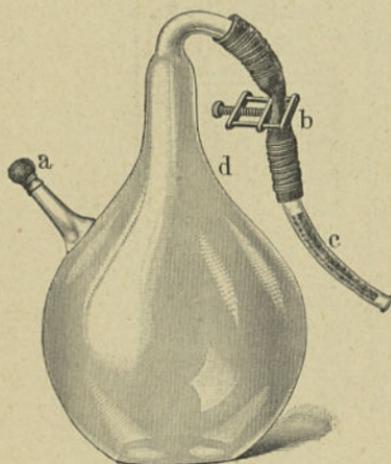


Fig. 78.

permettent d'envoyer la levure fort loin, et il a aucune

Pour pouvoir faire l'expédition de la culture pure méthodiquement choisie, à l'état liquide, *Hansen* (Fig. 78) et l'auteur de ce livre (Fig 79) ont imaginé des ballons spéciaux. Ces ballons per-

(1) Les appareils décrits plus haut ont tous deux été construits par MM. *Burmeister* et *Wain* à Copenhague; l'appareil de *Hansen* et *Kühle* par M. *W. E. Jensen*, chaudronnier dans la même ville.

(2) Un appareil servant dans l'industrie de la fermentation,

difficulté à la transvaser sans danger dans le cylindre.

Pour expédier de petites quantités des cultures absolument pures, de manière à ce qu'elles puissent facilement et sûrement se multiplier, on se sert des petits flacons de Hansen (p. 25). On les relie dans la flamme au ballon Pasteur, ayant servi au développement de la culture pure. On porte une trace de la levure sur le coton dans le flacon, et on rebouche celui-ci dans la flamme avec un bouchon en amiante, que l'on enduit de cire à cacheter. Quand on veut se

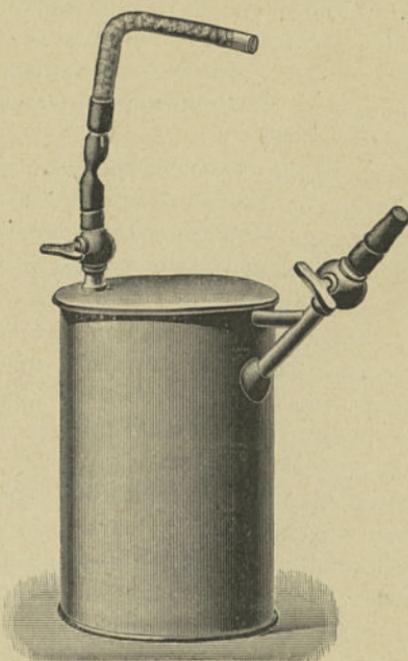


Fig. 79.

qui n'a obtenu qu'aujourd'hui l'importance réelle d'un instrument dans le système de culture pure de la levure de Hansen est l'appareil réfrigérant clos, mentionné déjà précédemment, qui permet d'introduire le moût dans les cuves de fermentation à l'état de pureté absolue, et chargé de la quantité d'air convenable. Des appareils spécialement aménagés dans ce but ont été construits par M. Felten, peu après la publication des « Études » de Pasteur et d'après les données théoriques de Pasteur. Ils n'ont cependant pas obtenu jusqu'à aujourd'hui une réelle importance pratique ; car, à quoi cela servait-il d'avoir un moût pur, du moment qu'on y semait avec la levure des germes de maladie ? Indépendamment de cela, les appareils de

servir de la culture pure, on remet le petit flacon en communication avec un ballon *Pasteur* contenant du moût, dans lequel on introduit la levure. On rince alors avec du moût contenu dans le ballon *Pasteur*, la levure qui se trouve sur le coton, pour l'amener ainsi dans le ballon lui-même.

Ce procédé a donné de bons résultats, par exemple pour l'expédition des cultures pures dans des contrées tropicales. Il a été possible ainsi d'envoyer avec peu de frais de grandes collections de cultures pures dans les contrées les plus éloignées. (1)

Il est de la plus haute importance que, même au bout de plusieurs années, on puisse toujours avoir à sa disposition, exactement la même levure dont on avait fait choix, en la conservant au laboratoire, pure, dans une solution à 10 0/0 de saccharose. Dans une telle solution, les levures de culture restent en vie pendant plusieurs années, sans altération de leurs qualités (2).

Les cultures en masse absolument pures de races de levure choisies méthodiquement et préparées pour l'in-

M. *Velten* sont d'une construction peu heureuse, l'air se stérilisant par le passage à travers des tubes rouges. Une disposition excellente se trouve par contre dans « l'appareil de Carlsberg ». Ce n'est que maintenant que l'on a la levure pure, que l'utilité de tels appareils apparaît distinctement, et à l'avenir les bacs ouverts tendront par conséquent à disparaître.

(1) L'expédition d'échantillons de levure dans du papier à filtrer stérilisé, a un tout autre but. On emploie ce procédé pour envoyer une levure impure de brasserie à un laboratoire, afin d'obtenir de cet échantillon une culture pure.

(2) Il n'est guère prudent de conserver des organismes de la fermentation dans des gélatines. Ainsi *Percy Frankland* a observé que des bactéries zymogéniques sont sujettes à perdre plus ou moins complètement leur puissance fermentative, lorsqu'elles sont cultivées d'une manière suivie dans un milieu solide. Quelquefois la puissance fermentative disparaissait après

dustrie, sont entrées maintenant, depuis que *Hansen* a fait, en 1883, ses premiers essais dans la célèbre brasserie du Vieux-Carlsberg, à Copenhague, dans de nombreuses brasseries de tous les pays où se fabrique de la bière, non-seulement en Europe, mais aussi en Amérique, en Asie et en Australie.

Le système de *Hansen* ayant été développé en premier lieu dans la fermentation basse de la brasserie, il devait nécessairement trouver sa première application dans des brasseries de ce genre. Aussi a-t-il atteint ici le plus haut degré de perfection, et quiconque désire se familiariser avec l'emploi de ce système, dans l'une ou l'autre branche de l'industrie de la fermentation, devra, par conséquent, toujours commencer par étudier les résultats obtenus dans la fermentation basse de la brasserie.

En 1884, l'auteur de ce livre a introduit les premières races de levures hautes sélectionnées, cultivées à l'état de pureté, dans la pratique brassicole. On objecta à leur application que les températures élevées de ces fermentations rendraient la levure pure bientôt impure. L'expérience a démontré combien peu cette objection était fondée, et qu'au contraire, l'emploi d'une race unique, sélectionnée, fut un grand progrès dont ce domaine de l'industrie retira de considérables avantages. Plus tard on objecta encore qu'il était impossible d'obtenir, avec une espèce unique, une fermentation secondaire convenable — ce qu'on avait d'ailleurs déjà prétendu à tort de la levure basse. C'est principalement *van Laer* qui avait

une seule culture. *Nencky* fit la même remarque pour certaines bactéries lactiques. L'auteur de ce livre a constaté que les levures de bière de fermentation haute employées en brasserie perdent, après conservation dans de la gélatine, plusieurs de leurs qualités les plus appréciées dans la pratique, vu que les cultures de cette provenance clarifiaient plus lentement et atténuaient trop.

soutenu cette idée ; tout en admettant l'existence de certains types de levures basses pouvant provoquer une fermentation secondaire normale, il prétendit, que l'auteur de ce livre avait attribué à tort ces mêmes qualités aux levures hautes. Malgré les expériences exactes sur lesquelles nous pouvions nous appuyer et malgré les résultats pratiques obtenus chaque fois avec une *seule espèce sélectionnée*, et cela même dans les conditions particulières des *brasseries anglaises*, et bien que toute preuve réelle de la justesse de l'assertion contraire fit défaut, on ne tint aucun compte de notre conclusion, et l'auteur cité prépara des *mélanges d'espèces de levures hautes*, qui furent introduites dans les brasseries, où elles devaient répondre aux exigences industrielles, en produisant, l'une la fermentation principale, l'autre la fermentation secondaire. La possibilité de pouvoir préparer une telle « levure composée » n'était nullement exclue ; mais si même les préparations de *van Laer* devaient donner en pratique de bons résultats, il ne serait évidemment pas prouvé par là que ces bons résultats sont dûs à l'action de la « levure composée ». Il faudrait tout d'abord pouvoir prouver que cette nouvelle levure était en pratique réellement une levure composée, c'est-à-dire que les espèces qu'elle renferme pouvaient vraiment agir simultanément. Nous avons examiné avec *J. Chr. Holm* plusieurs de ces préparations proposées à l'application industrielle, et constaté que dans les premières fermentations, l'une des deux espèces prédominait surtout, tandis que les autres espèces *disparaissaient pendant les fermentations suivantes*.

Le problème consistant à préparer une vraie « levure composée » n'était donc pas résolu. Les observations faites dans le cours des années suivantes, aussi dans les brasseries anglaises, a toujours confirmé l'exactitude de nos premiers résultats, à savoir, qu'en fermentation

haute comme en fermentation basse, il est possible de mener à bonne fin la fermentation tout entière, tant principale que secondaire, avec une seule espèce sélectionnée.

Les recherches de *Hansen* qui firent époque ont, cela va sans dire, fait naître dans ces dernières années, une littérature très importante, renfermant entre autres, nombre d'ouvrages de valeur, se proposant d'éclaircir différents points du système, et d'en faciliter ainsi l'intelligence exacte et l'emploi pratique.

Cela nous entraînerait trop loin de passer en revue même les points principaux de cette littérature. Nous nous bornerons ici, pour terminer cet exposé, à citer quelques paroles des autorités les plus compétentes, qui, en éclairant la question de différents côtés, ont acquis un mérite incontestable pour l'introduction du système dans les différents pays.

M. le professeur D^r *C. Lintner* donne l'aperçu suivant sur l'état des choses en 1885 (1).

Depuis que plusieurs brasseries ont employé les races de levures de *Carlsberg*, cultivées à l'état de pureté, et depuis que la Station Scientifique de Munich a, elle aussi, introduit dans les brasseries de la levure de cultures pures provenant de levures de Munich, les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

1. La contamination d'une levure, d'ailleurs normale, par des levures dites sauvages, peut la rendre peu à peu impropre à la fabrication d'une bière de bon goût et facile à conserver.

2. Une contamination de ce genre peut se produire par les levures sauvages suspendues dans la poussière de

(1) *Zeitschrift für das gesammte Brauwesen*, p. 399, 1885.

l'air en été et en automne, ou par l'introduction d'autres levures, ou par la lie des bacs.

3. La méthode d'analyse et de culture pure de *Hansen* permet d'isoler d'une levure contaminée la levure de brasserie que l'on désire avoir à l'état de pureté.

4. La levure de culture possède à un haut degré les qualités de la levure originale avant sa contamination, tant sous le rapport du degré d'atténuation, que sous celui du goût et de la facilité de conservation des bières en question.

5. Il existe plusieurs variétés de la levure basse normale (*Sacch. cerevisiæ*), jouissant de propriétés spécifiques qui restent fixes, et constituent les particularités de la race.

M. le professeur *Aubry*, directeur de la Station Scientifique de brasserie à Munich écrit en 1885 (1) : « Outre les brasseries mentionnées (Spatenbräu et Leistbräu, Munich), un grand nombre de brasseries du pays et de l'étranger avaient reçu de la levure pure de *Carlsberg*, et s'en étaient servi comme levain à titre d'essai. Bien entendu les résultats que l'on avait attendus n'avaient pas été atteints partout, le degré de fermentation fut, dans la plupart des cas, trouvé trop bas (2), le goût n'était pas celui que l'on aimait généralement dans l'endroit, etc., mais tous les rapports dont nous avons pu avoir connaissance étaient favorables en ce qui concerne la conservation facile, la limpidité et l'absence du goût de levure.

Les bonnes qualités de cette levure ont en outre décidé

(1) Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, 1885.

(2) Levure basse n° 2 de Carlsberg, une espèce clarifiant rapidement.

plusieurs brasseries de l'introduire à demeure, ainsi la brasserie de Liesing, près Vienne. Pendant la saison de brassage actuelle, la brasserie de Spaten, à Munich, a utilisé sur la plus grande échelle, de la levure provenant de Carlsberg, et pareillement dans la brasserie du Franziskanerkeller, à Munich, une grande partie des levains employés pendant l'hiver provenait de cultures pures de Carlsberg. La marche de la fermentation et les résultats concernant le goût, la mousse et la conservation des bières répondaient à toutes les exigences. L'atténuation un peu basse semble relever du caractère de la levure, attendu qu'elle reste constante. Le goût des bières diffère, au commencement, quelque peu du goût ordinaire des bières de Munich ; dans les générations ultérieures, il s'en rapproche cependant un peu, tout en restant moelleux et agréable. »

M. le docteur *Will*, chef de laboratoire, écrit en 1885 (1) « Si donc il est possible, comme je crois l'avoir prouvé, de reconnaître sûrement les espèces de levure qui sont dangereuses pour la brasserie, nous devons ici tirer profit de cette découverte pour la pratique et n'employer que des levains qui ne présentent pas les caractères indiqués propres aux espèces nuisibles, et qui causent souvent des troubles des plus préjudiciables dans la fabrication. Mais ceci ne sera possible que lorsque les cellules de levure, possédant les qualités de la levure basse normale, seront isolées des levains de brasserie ordinaires, et cultivées dans des conditions qui excluent toute contamination, autrement dit, *lorsque des levures de culture pure seules*, seront employées dans la fabrication. C'est à *Hansen* que revient aussi, dans cet ordre de choses, le grand mérite d'avoir tracé le chemin, et d'avoir élaboré une méthode permettant d'atteindre le but proposé. Les succès émi-

(1) Allgemeine Brauer und Hopfenzeitung, 1885.

nents qui ont été obtenus au Vieux-Carlsberg avec la levure de culture pure, ont déjà engagé beaucoup de brasseurs à travailler avec de la levure pure, et en général les résultats ont été satisfaisants, pourvu que les races aient été choisies de manière à être identiques avec la levure basse normale, sous le rapport du degré de fermentation et du goût.

» Puisse, par conséquent, la connaissance de la valeur de la levure de culture pure pénétrer de plus en plus dans le monde de la brasserie et anéantir ainsi maint préjugé contre la levure pure; puissent aussi les petites brasseries qui, abstraction faite de cela, ont à combattre bien des difficultés, être bien convaincues qu'avec l'introduction de la levure de culture pure dans une brasserie, bien dirigée d'ailleurs, on parvenait à vaincre une série de calamités. Les frais qu'on aura eu à supporter ne seront pas sans porter des fruits en abondance.»

M. le docteur *Reinke*, chef de laboratoire à la station d'essai pour la brasserie à l'école agricole supérieure de Berlin, donne, en 1888, à l'état de choses, une expression significative de la manière suivante (1) :

« Sans l'étude exacte des travaux fondamentaux de *Hansen* et sans en faire l'application, personne n'est à même aujourd'hui, de supporter à la longue la concurrence en brasserie. Les travaux de *Hansen* ont amené une révolution dans l'exploitation de la brasserie, en particulier dans le traitement de la levure. »

M. le docteur *Bělohoubek*, professeur à l'école polytechnique de Bohême, à Prague, écrit dans sa biographie de *Hansen* en 1889 (2) :

« Personne ne s'étonnera que l'établissement du prin-

(1) *Chemiker-Zeitung*, 29 décembre 1888, p. 1749.

(2) *Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen*, Munich, 1889, p. 505. — *Manuel du brasseur*, 1891.

cipe de la culture pure de la levure et la critique vraiment anéantissante de l'évolution de la fermentation, qui ne dépendait que du hasard, telle qu'elle était généralement pratiquée jusqu'ici, et avant tout que l'introduction de la levure de culture pure dans la brasserie ait soulevé dans les rangs des praticiens, à part quelques exceptions dignes d'éloges, d'abord de l'étonnement, puis de la gaieté, et finalement une opposition exaspérée. Quiconque est du métier, sait quel esprit conservateur entêté il existe dans le monde brassicole, où l'on montre non seulement de la méfiance et de la passivité envers toutes les innovations et idées réformatrices, mais où on leur oppose souvent la résistance la plus opiniâtre. Heureusement que plusieurs circonstances importantes s'allièrent pour aider à combattre cette opposition, dont finalement on triompha, malgré le concours empressé que lui avaient prêté quelques savants spécialistes, surtout dans l'Allemagne du Nord et dans l'Autriche-Hongrie. Ce qui contribua essentiellement à la victoire des idées de *Hansen*, ce fut leur justesse, qui fit que les premières autorités de l'Europe en matière de la zymotechnie les accueillirent avec une pleine conviction : ce fut ensuite le fait, qu'aussi en dehors du Danemark, des spécialistes sérieux commencèrent à s'occuper de la culture pure de la levure ; troisièmement, ce furent les résultats excessivement favorables, qui furent obtenus avec la levure pure dans la pratique de la brasserie ; et enfin ce fut la circonstance, que le docteur *Hansen* parvint en 1887, avec l'aide de *M. Kühle*, directeur de la brasserie du Vieux-Carlsberg, à construire un appareil pour la culture pure, permettant la production en masse des quantités de levure pure, relativement petites, obtenues dans les laboratoires. — Aujourd'hui, des centaines de brasseries tirent une levure mère de culture pure de laboratoires, qui s'occupent de la culture pure de levure de bière, et des milliers de bras-

series le font indirectement, en faisant venir à leur tour leurs levains de ces établissements. *L'introduction générale de la levure pure en brasserie n'est donc aujourd'hui plus qu'une question de temps.*

Si l'on examine dans toute son objectivité, l'importance de ce fait, en l'appliquant aux conditions du travail dans les brasseries de fermentation basse de l'Europe, on ne pourra guère s'empêcher de reconnaître que la réforme inaugurée par *Hansen* a une portée bien plus grande, que cela n'est en général admis. Une conséquence de cette réforme se discute déjà parmi les hommes compétents, à savoir la suppression des bacs réfrigérants dans toutes les brasseries travaillant avec de la levure pure, pour la raison que ces appareils permettent une forte infection du moût par des microorganismes en général, et surtout par des bactéries et par des espèces de levure dites « sauvages ». Aussi c'est avec raison que l'on a proposé une filtration des moûts houblonnés, ou telle autre méthode permettant d'éliminer les matières qui provoquent des troubles (c'est-à-dire la lie des bacs), suivie d'une saturation avec de l'air filtré et d'un refroidissement artificiel. Malgré cela, toutes les mesures de précaution à prendre pour éviter une nouvelle infection du moût dans le local de la fermentation et dans la cave de garde ne sont nullement encore épuisées. Ce ne sera que lorsque ces nouveaux problèmes auront été résolus d'une manière satisfaisante, peut-être par l'introduction de vases à fermentation clos, formés d'une matière convenable, par la stérilisation des cuves de fermentation et des foudres de garde, par une installation plus rationnelle des caves de fermentation et de garde, par la ventilation de ces locaux au moyen d'air filtré, etc., ce n'est qu'alors qu'on pourra jouir pleinement, tant dans le monde des producteurs que dans celui des consommateurs, de tous les grands avantages qu'il y a d'obtenir une bière de meilleure

qualité et d'une conservation facile, avantages qui sont la conséquence de l'emploi de la levure pure.

Ce qui vient d'être indiqué dans les lignes précédentes sur l'importance de la levure de culture pure, ne se rapporte uniquement qu'à la levure de fermentation basse. *A priori* il n'y avait nullement lieu de douter que la méthode de *Hansen* pour la culture pure de la levure ne pût être appliquée avec le même succès à la levure de bière de fermentation haute. La justesse de cette supposition a été depuis prouvée expérimentalement par *Alfred Joergensen*, et la levure pure haute peut être appliquée dans l'art brassicole avec le même succès que la levure pure basse. L'auteur de ces lignes a la conviction qu'on devrait obtenir de grands avantages pour les distilleries et surtout pour les fabriques de levure pressée, par l'introduction de races de levures cultivées à l'état de pureté absolue. Dans les distilleries on aurait — toutes choses égales d'ailleurs — des atténuations plus favorables et un plus grand rendement d'alcool, en comparaison des résultats moyens pouvant être obtenus jusqu'à présent, tandis que dans les fabriques de levure pressée, le choix convenable des levures de culture pure permettrait d'atteindre un plus grand rendement en levure pressée. Dans cette dernière industrie, l'emploi de trempes claires serait peut-être préférable à celui des trempes chargés de drèches usité jusqu'ici. »

Dans le mémoire de *H. Bungener* « la levure de bière » 1890 (1), il se trouve la remarque suivante sur le contraste entre l'ancienne et la nouvelle période : « En France, le système de *Hansen* a été préconisé par *L. Marx*, *A. Flühler* et *Kokosinski*. Appliqué dans quelques brasseries — depuis peu de temps, il est vrai, —

(1) *Moniteur scientifique* du D^r Quesneville, juillet-août, Paris 1890.

il est sur le point de l'être dans d'autres. Nous sommes persuadé qu'en France, comme partout ailleurs, son adoption dans toutes les usines de quelque importance n'est plus qu'une question de temps. Il est hors de doute, en effet, qu'il assure la réussite et la régularité d'une des phases les plus importantes de la fabrication, dont le succès était précédemment subordonné dans une large mesure aux caprices du hasard. »

M. le docteur *C. J. Lintner*, professeur à l'école polytechnique de Munich, écrit en 1891 (1) : « Dans les rapports sur les progrès réalisés en brasserie, il a été question, à plusieurs reprises, des célèbres recherches du savant danois *Emile-Christian Hansen* et de leur application pratique. Dans ce journal, il n'a pas été donné jusqu'à présent d'exposé complet des réformes et des méthodes dues à *Hansen*, et cependant cela serait à désirer, eu égard à l'importance éminente qu'elles ont acquise depuis tantôt sept ans qu'elles ont été introduites dans la brasserie. Jusqu'à présent, ce sont principalement les brasseries qui en ont tiré profit, mais le système de *Hansen* vient de faire aussi son entrée dans la distillerie et dans la fabrication de levure pressée, et en l'adoptant, ces branches de l'industrie de la fermentation s'assurent également des avantages importants. »

En Angleterre, plusieurs des autorités les plus célèbres ont fait ressortir l'importance réformatrice des travaux de génie de *Hansen*. Sur le nombre se trouve M. le docteur *Percy Frankland*, qui s'exprime de la manière suivante (2) :

« *Emile-Christian Hansen*, Copenhague, a extraordinai-

(1) *Dingler's Polytechnisches Journal*, 72^e année, vol. 279, faciscule 9.

(2) *Royal Institution of Great Britain*. Assemblée du 19 février 1892.

rement augmenté nos connaissances sur les organismes producteurs d'alcool ou levures. Il a démontré qu'il existe plusieurs formes distinctes qui, bien qu'elles ne diffèrent que très peu au point de vue morphologique, possèdent néanmoins des propriétés caractéristiques bien déterminées, particulièrement sous le rapport de la nature de certaines petites quantités de produits secondaires qu'elles font naître, et qui sont très importants, attendu qu'ils prêtent à la bière obtenue des caractères distinctifs. Hansen a indiqué comment ces différentes espèces de levures pouvaient être cultivées à l'état de pureté, même en des quantités suffisantes pour l'application industrielle, et il a, par cela, transformé de fond en comble la pratique brassicole sur le continent. Car, depuis les dernières années, ces levures pures, dont chacune possède des caractères spéciaux, se cultivent soigneusement dans des laboratoires installés *ad hoc*, d'où elles sont expédiées dans toutes les parties du monde, après que l'on a choisi les espèces de levures spéciales, propres à produire les différentes sortes de bière que l'on veut. De cette manière, on a réussi à introduire la science exacte et un succès certain dans une industrie où, précédemment, tant de choses dépendaient du hasard, et où presque tout reposait sur la routine et sur des travaux sans contrôle.»

Dans la *brasserie de fermentation haute*, le système Hansen est aujourd'hui adopté dans tous les pays.

Parmi tous les jugements prononcés, on pourrait citer en premier lieu le rapport suivant de Melbourne, en Australie, venant de M. J. C. Mac Cartie (1) :

« La levure pure (2) donne une bière moelleuse et pleine

(1) *The Brewers' Journal*, Londres 1889, n° 291, p. 489.

(2) Une race de « Burton » cultivée d'une levure anglaise dans le laboratoire de l'auteur du présent livre.

de bouche, ayant une grande limpidité, et de conservation facile, s'appropriant surtout à être mise en bouteilles. J'arrive ici à un fait qui intéressera le lecteur. M. de Bavay et moi nous lûmes avec quelque étonnement les rapports faits par quelques hommes de science anglais, sur la difficulté ou l'impossibilité d'obtenir une fermentation secondaire, en n'employant qu'une race unique de levure de *Saccharomyces cerevisiæ*. Or, nous n'avions pas rencontré la moindre difficulté à obtenir une fermentation secondaire dans les bières faites avec les levures d'Australie ou de « Burton ». J'ai examiné très souvent, avec M. de Bavay, du « stock » ainsi que des « bottled ales », dont la fermentation avait été produite par des cultures pures de la levure de Burton, et pour quiconque vit l'écume et le couvercle sur les bières, il n'y eut plus de doute qu'elles ne se trouvassent dans une fermentation secondaire énergique. M. de Bavay me communiqua que souvent il obtenait une fermentation secondaire bien prononcée dans l'espace de 15 jours, après la clarification (racking) de la bière, et ceci chaque fois que la levure utilisée arrivait fraîche du laboratoire et qu'elle était par conséquent, pour parler pratiquement, vierge du plus léger mélange d'autres races de levure. » (La brasserie de M. de Bavay, à Melbourne, est à fermentation haute).

Se basant sur ces faits, M. Mac Cartie ne doute pas du tout, que dans peu d'années, le système de Hansen ne fut aussi adopté pour la fermentation haute dans toutes les brasseries importantes du monde. Son rapport détaillé offre un grand intérêt surtout par le fait qu'il nous donne une nouvelle preuve fournie par la pratique, de la différence des races du *Saccharomyces cerevisiæ*, et par conséquent en même temps une nouvelle invitation urgente, à faire un choix parmi ces races de celles qui répondent le mieux aux exigences pratiques.

M. le docteur *E. Kokosinski*, directeur du laboratoire de Lille, écrit (1) :

« C'est au mois d'août 1888, qu'après trois années d'études préalables, j'ai introduit, pour la première fois, la levure pure dans une brasserie de fermentation haute de Lille. Peu de temps après, au commencement de 1889, je l'ai fait entrer dans quelques autres brasseries de Lille, Roubaix, Douai et Saint-Omer, et actuellement il y a, dans la région du Nord, une quinzaine de brasseries qui emploient la levure pure *et en obtiennent toutes, sans exception, d'excellents résultats industriels.* »

Il résume ses *expériences pratiques*, concernant les *bières fabriquées avec de la levure pure de fermentation haute*, dans les points suivants :

1° Elles ont le goût spécial recherché par le brasseur ;

2° Ce goût est régulier et toujours le même ; il se distingue par une grande franchise ;

3° La clarification en est plus facile et plus rapide ;

4° Enfin, elles sont plus résistantes à l'action des bactéries et se conservent mieux.

On voit, par ce qui précède, que si la méthode *Hansen* a rendu de grands services dans la fermentation basse, elle a commencé à en rendre et elle est appelée à en rendre de bien plus considérables encore dans la fermentation haute qui n'a pas, comme l'autre, le secours du froid pour la garantir contre l'action et le développement des ferments de maladie ».

(1) Application industrielle de la méthode *Hansen* à la fermentation haute dans le Nord de la France, *Compte rendu de la Station Scientifique de brasserie*, Gand, 1890.

Tandis qu'antérieurement déjà, différentes brasseries, en Amérique et en Australie, qui travaillent à la manière anglaise, avaient adopté la réforme, en employant des cultures pures préparées par l'auteur de ce livre, ce ne fut qu'en 1892 que *W. R. Wilson* parvint à introduire cette innovation dans une brasserie de Londres (*Combe et C^{ie}*), en se servant d'une espèce de levure unique, choisie et cultivée, tant pour produire la fermentation principale que la fermentation secondaire.

W. R. Wilson écrit (*The Brewers' Journal*, page 527, Londres, 1892) :

« Quelques bassins ont fermenté avec de la levure pure et ils ont été comparés à d'autres traités avec de la levure impure. Partout on reconnut que, autant qu'on pouvait en juger jusque-là, l'ale fermentée avec de la levure pure était incontestablement supérieure à l'autre. Le système de culture pure de *Hansen* s'est montré applicable à la fabrication de l'ale, aussi bien qu'à celle du porter et du stout ».

Plus tard le système a été appliqué entièrement dans cette brasserie, et d'après le compte rendu des publications anglaises, nombre de brasseries de la Grande-Bretagne ont adopté avec succès l'emploi de l'espèce de levure choisie par *Wilson*.

Dans le manuel de brasserie publié récemment par *W. J. Sykes*, l'auteur donne un exposé correct des conditions telles qu'elles existent dans la fermentation haute :

« — L'introduction du système dans les brasseries de fermentation haute ne fut de loin pas aussi rapide, principalement par suite des préjugés et opinions préconçues mal fondées, que la levure d'une seule espèce ou variété n'était pas capable de provoquer dans les foudres une fermentation secondaire assez énergique.

» L'in vraisemblance de toutes ces opinions a suffisamment été prouvée par *Alfred Joergensen* à Copenhague,

qui, depuis un grand nombre d'années, s'occupe de la sélection de types de levures de culture pure pour des brasseries de fermentation haute, ajoutant qu'il a introduit avec le plus grand succès des cultures pures de levures dans de nombreuses brasseries de ce genre.

» *Vuyksteke, Bau* et d'autres auteurs ont tous donné des indications identiques, et l'auteur de ce livre sait que, depuis plusieurs années, la levure pure est employée avec beaucoup de succès dans deux grandes brasseries de ce pays ».

Il est inutile d'ajouter que le nombre des brasseries anglaises, qui travaillent d'une manière suivie avec des levures provenant d'une espèce *unique*, dépasse celui que l'auteur a indiqué.

D'autres zymotechniciens tels que *Delbrück* (Berlin), *Flühler* (Lyon), *Griessmayer* (Munich), *Langer* (Möding), *Prior* (Nuremberg), *Maercker* (Halle), *Marx* (Marseille), *Schwackhofer* (Vienne), *Thausing* (Vienne), et d'autres encore, se sont exprimés, sur l'importance des innovations de *Hansen*, absolument de la même façon que les précédents. Plusieurs des anciens adversaires du savant se trouvent maintenant aux rangs de ses plus chauds partisans.

Dans ce qui précède, il n'a été question que de la brasserie (1). Mais les innovations de *Hansen* se sont aussi introduites dans d'autres branches de l'industrie.

(1) La « culture pure naturelle » ou « culture naturelle de la levure », proposée par *Delbrück*, qui devait s'effectuer dans les brasseries mêmes, en vue de débarrasser la levure des espèces sauvages, n'est basée que sur des observations isolées, par exemple sur le fait que certaines espèces de levures sauvages montrèrent, dans des essais parallèles à de basses températures, un meilleur développement que les races de levures de culture, employées dans les mêmes expériences. Il est évident — comme l'expérience l'a d'ailleurs démontré — que de tels faits isolés ne peuvent suffire pour établir une règle générale. Il ne peut nullement être question d'obtenir des résultats sûrs quant

où l'on a besoin de fermentations alcooliques. C'est ainsi que l'on a déjà fait des essais en maints endroits dans la fabrication de la levure pressée et dans la distillerie, et le système a été introduit avec succès dans beaucoup d'usines. D'une grande valeur en ce domaine est l'observation faite par différents chercheurs, mais surtout par *Delbrück*, que dans les distilleries, l'application de races de levures de culture pure permet de constater une augmentation du rendement en alcool sans une atténuation bien supérieure. Ceci s'explique que certains ferments étrangers qui absorbent une partie du liquide nourricier sans produire d'alcool sont réprimés par l'emploi de la culture absolument pure.

En 1888 déjà, un des élèves de *Hansen*, *L. Marx* (Marseille) a commencé, comme il a été indiqué plus haut, à l'appliquer à la fermentation du vin; plus tard, d'autres savants ont travaillé en France dans le même but, ainsi que *Müller-Thurgau* en Suisse, *Forti* et *Pichi* en Italie, *Mach* et *Portele* en Autriche, *Wortmann* en Allemagne. Pour la fermentation du cidre⁽¹⁾, de nombreuses expériences pratiques ont été faites par *Kayser* en France et par *Nathan* en Wurtemberg.

Dans le cours des années l'auteur de ce livre a souvent

à la répression des ferments étrangers par les procédés recommandés par *Delbrück*, procédés qui sont d'ailleurs déjà depuis bien des années connus et employés dans la pratique, tels que de pomper le moût en fermentation sur de nouvelles cuves après l'apparition des premiers signes extérieurs de la fermentation, ou bien d'employer comme levain du moût en pleine fermentation (*Kraeusen*) etc., et il est certainement encore bien moins possible que ces procédés puissent nous guider sûrement dans le choix des meilleures races de levures de culture. La proposition de *Delbrück* n'a donc pas atteint son but, à savoir « de perfectionner et d'étendre les avantages résultant de la culture pure ».

(1) Lire *FABIUS DE CHAMPVILLE, Comment s'obtient le bon cidre*, in-8. Paris, 4 fr.

eu occasion de démontrer aussi aux praticiens de ce domaine, les avantages qui se rattachent à l'emploi de races de levures sélectionnées, non-seulement dans la fabrication du vin de raisins, mais encore dans celle du vin de fruits et de grains. Nous trouvons un exemple particulièrement intéressant de l'énergie que déploient un grand nombre de races de levures de vin, dans les contrées du Nord, où la fabrication du vin, préparé avec du *jus de raisins secs* et fermenté avec de véritables levures de vin, se fait sur une grande échelle.

Quant à l'importance de la réforme dans le domaine de la fermentation vinaire, nous citerons encore à la suite de ce qui a été mentionné plus haut, quelques remarques du professeur *D^r J. Wortmann*, directeur de la Station Oenologique de l'Association des viticulteurs allemands à Geisenheim. Il s'exprime de la manière suivante :

« En résumant les résultats des divers comptes rendus, pour faire ressortir les avantages généraux, dus à l'application industrielle de la levure pure, nous remarquons tout d'abord que l'effet favorable qui en résulte est évident partout où la levure pure peut être employée sans encombre, c'est-à-dire dès le début sans organismes concurrents, ou, en d'autres termes, partout, où la fermentation que l'on a en vue peut facilement, aussi en pratique, être mise en train et terminée exclusivement avec la levure pure ajoutée. Ceci concerne principalement la fermentation des vins mousseux ainsi que les fermentations complémentaires des vins. Mais nous voyons également ici, et ceci est précieux, que pour ce qui concerne la méthode adoptée d'application des levures, nous sommes sur la bonne voie, vu que dans ces premiers essais elle fournit de si bons résultats.

» De plus, d'après les conclusions actuelles, nous sommes déjà certains d'atteindre, avec les levures pures, des résultats favorables dans tous les cas où des moûts de

raisin de qualité inférieure, ou bien des moûts de fruits et de grains, devront être fermentés. Abstraction faite des levures renfermées dans les moûts de fruits et de grains — il s'agit assurément surtout de la levure apiculée et d'autres formes nuisibles — qui sont bientôt réprimées par une levure pure à grande énergie fermentative, nous pouvons également mettre à profit le caractère de la race de levure mise en jeu, vu que la disparition du bouquet inhérent à ces moûts permet à la levure pure de se manifester dans toute sa particularité, surtout quant à la formation du bouquet.

» Dans la fermentation de moûts de raisins avec des levures pures, les levures renfermées dans ces moûts mêmes, qui peuvent très bien, elles aussi, exercer un pouvoir ferment et une action énergiques, ne pourront guère être appliquées avec succès que si l'on réussit à les introduire dans le moût de manière qu'elles aient, dès le début, la prépondérance sur les levures préexistantes. Ceci est une *conditio sine qua non*. Des résultats d'expériences pratiques font voir clairement que la chose est possible (1).

» De nombreuses expériences de plusieurs années nous ont appris que la répression des organismes de toutes espèces : moisissures, levures sauvages, mycodermes, bactéries, qui, provenant de l'enveloppe de grains, sont renfermées dans le moût, répression due à l'ensemencement de levures de races distinctes, c'est-à-dire, dont l'énergie et l'action sont connues, ou, en d'autres termes, que l'emploi de levure pure à la fermentation de raisins,

(1) Les connaissances actuelles sur l'application pratique des levures pures et les conséquences qui en résultent pour leur culture et leur emploi. (Conférence faite au treizième Congrès des viticulteurs allemands à Mayence en 1894). Voyez aussi le mémoire de Wortmann : *Anwendung und Wirkung reiner Hefen in der Weinbereitung*. Berlin 1895.

de fruits et de grains, conduit souvent à une amélioration profonde de la qualité des produits de la fermentation. Mais l'action favorable de la levure pure n'aura nullement atteint ses limites avec cette amélioration de la qualité du vin, qui, souvent, se manifeste déjà pendant la fermentation même, par l'apparition de substances constituant la finesse du bouquet que l'odorat et le goût décèleront en tous cas après fermentation. Car, pendant la fermentation, la levure pure ne s'est pas fait valoir uniquement sous le rapport de l'activité fermentative, mais pour atteindre son but, elle a enrayé, et peut-être même empêché en partie, le développement de cette multitude d'organismes, provenant des enveloppes de grains, qui apparaissent toujours spontanément dans le moût, et parmi lesquels il faut compter non seulement les espèces de levures nuisibles, mais encore des espèces directement pathogéniques, telles que les mycodermes, bactéries acétiques, etc. *Il en résulte que non seulement le moût, mais encore le produit de la fermentation, le vin, est dominé par la levure pure, dans tous les stades ultérieurs de son développement, c'est-à-dire souvent encore pendant bien des années.* L'influence favorable de la levure pure ne se manifestera donc pas uniquement pendant le temps qui suivra immédiatement la fermentation principale, mais doit durer. Les vins en bouteilles pourront surtout sensiblement gagner par la présence de levure pure et la répression d'organismes étrangers qui s'y rattache. Autant que, depuis l'introduction de la levure pure dans la pratique viticole, les expériences contrôlées et connues permettent de juger, on a aussi pu constater ici l'influence manifeste et durable qu'exerce la levure pure sur le produit de la fermentation (1). »

(1) *Ueber künstlich hervorgerufene Nachgärungen von Weinen in der Flasche und im Fasse. Landwirtsch. Jahrbücher* 1897.

Une conséquence des célèbres découvertes de *Hansen* fut l'installation de *laboratoires spéciaux*, ayant pour but de préparer la levure absolument pure pour la pratique, d'exécuter les analyses nécessaires pour le contrôle de la fabrication, d'initier la jeune génération dans l'intelligence exacte de ces innovations et de lui en apprendre l'application rationnelle. Il existe aujourd'hui, dans presque tous les pays, des institutions de ce genre, tant subventionnées par les différents états, que privées, d'où sont déjà sortis nombre de professeurs, d'analystes et de praticiens, qui travaillent avec énergie et intelligence, afin de donner aux idées du savant danois une extension scientifique et pratique toujours plus grande.

Les travaux de *Hansen* ont aussi agi sur l'*exploitation de la métairie*, où l'on emploie déjà, comme cela a été dit dans un chapitre précédent, des cultures pures de bactéries lactiques, pour l'acidification de la crème en grand ; et enfin ils ont aussi eu leur écho dans la *fermentation du tabac*, où des essais ont été faits principalement par *Schlæsing* et *Suchsland*, dans le but de donner aux feuilles de tabac un arôme déterminé en ajoutant pendant la fermentation des cultures pures de certaines espèces de bactéries.

L'idée fondamentale de tous ces travaux réformateurs n'est autre en définitive que le principe établi depuis des siècles et des siècles, dans l'horticulture et dans l'agriculture, de semer uniquement l'espèce que l'on a en vue, pure et vierge de toute semence étrangère.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMETZ, L. — *Saccharomyces lactis*, eine neue Milchezucker vergärende Hefeart. — Centralblatt f. Bakt. V. 1889.
- Ueber einen Erreger der schleimigen Milch, *Bacillus lactis viscosus*. Milch-Zeitung. 1889.
 - Die Bacterien normaler und abnormaler Milch, Oesterr. Monatsschrift für Tierheilkunde und Tierzucht. XV. 1890.
 - Untersuchungen über *Bacillus lactis viscosus*, einen weit verbreiteten milchwirtschaftlichen Schädling. — Berliner landwirtschaftl. Jahrbücher. 1891.
 - Ueber die Ursachen und Erreger der abnormalen Reifungsvorgänge bei dem Käse. Brême. 1893.
 - Ueber *Micrococcus Sornthalii*. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
- ADERHOLD, R. — Untersuchungen über reine Hefen. III. Theil. Die Morphologie der deutschen *S. ellipsoideus*-Rassen. Landw. Jahrbücher herausgeg. v. Thiel. Berlin. 1894.
- AHLBURG. — Ueber *Aspergillus oryzae*. — Mitteil. der deutschen Gesellschaft für Natur- und Voelkerkunde Ost-Asiens, 16. Heft, 1876. Dinglers polyt. Journal, 230. 1878.
- AMTHOR, C. — Studien über reine Hefen. — Zeitschrift für physiologische Chemie. XII. 1888.

- AMTHOR, C. — Ueber den *Saccharomyces apiculatus*. — Zeitschr. für physiologische Chemie. XII. 1888.
- Ueber Weinhefen. — Zeitschr. für angew. Chemie. 1889.
- Beobachtungen über den *Saccharomyces apiculatus*. — Chemiker-Zeitung. 1891.
- APPERT. — Le livre de tous les ménages ou l'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales. — 4^e édit. (1^{re} édit. 1810). Paris, 1831.
- ATKINSON. — The chemistry of saké-brewing in Japan, the processes of preparation of Koji and of fermentation. — Memoirs of the science département, Tokio Daigaku. No 6. 1881.
- AUBRY, L. — Ein Beitrag zur Klärung und Richtigstellung der Ansichten über reine Hefe. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich, 1885.
- Noch ein Wort über reine Hefe. — Ibid. 1885.
- Ueber desinfizierende Stoffe. — Ber. d. Wiss. Stat. Munich, 1887. 1889.
- Beobachtungen über Hefe. — Mitt. der Wissenschaftl. Station für Brauerei, Munich. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. 1892.
- AUERBACH, S. — Experimentelle Beiträge zur « natürlichen Reinzucht ». Wochenschr. f. Brauerei. XII. 1895.
- BABCOCK and RUSSELL. — Unorganized ferments of milk: a new factor in the ripening of cheese. 14 th. annual report. Wisconsin exp. Station. 1897.
- BABES, A. U. V. — Ueber ein Verfahren, keimfreies Wasser zu gewinnen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XII. 1892.
- BABO, A. v. und MACH, E. — Handbuch des Weinbaues und der Keller wirtschaft. Unter Mitwirkung von K. Portele, neu bearbeitet von E. Mach. Berlin. 1896.
- BAIER, ED. — Ueber Buttersäuregärung. Centralbl. f. Bakt. und Paras. 2. Abth. I. 1895.
- BAIL, TH. — Ueber Hefe. — Flora 1857.

- BAINIER, G. — Observations sur les Mucorinées. — Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. VI., T. XV. 1883
- BARY, DE. — Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozen und Bakterien. — Leipsic, 1884.
- Vorlesungen über Bacterien. 2. Ausgabe. Leipsic. 1887.
- Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria. By H. E. F. Garnsey, rev. by J. B. Balfour. Oxford, 1887.
- BAU, A. — Ueber die scheinbare Zunahme des Dextringehaltes in Bierwürzen während der Gärung. — Wochenschr. f. Brauerei. 1890.
- Ueber die scheinbare Zunahme des Dextringehaltes in Bierwürzen während der Gärung, sowie über die Bestimmung der Dextrose und des Dextrins in ihnen. — Wochenschr. f. Brauerei. 1890.
- Die Bestimmung von Maltose, Dextrose und Dextrin in Bierwürze und Bier mittels Reinkulturen von Gärungsorganismen. — Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk. V. Jahrg. IX. Bd. 1891.
- Ueber die Zusammensetzung der Würzen in Bezug auf Kohlehydrate. Wochenschr. f. Brauerei. Berlin 1891.
- Einige Bemerkungen über Hefereinzucht. Zeitschr. f. Spiritusindustrie, Berlin 1892.
- Ueber Obergärung und Reinzucht. Woch. f. Br. Berlin 1892.
- Beiträge zur Physiologie der *Monilia candida*. Woch. f. Brau. 1892.
- Ueber die Verwendung der Hefe zur quantitativen Bestimmung gärfähiger Substanzen. Chem. Ztg. 1893.
- Ueber Raffinose oder Melitriose und über ihre Abwesenheit im Bier. Wochenschr. f. Brauerei 1894.
- Der Sammelbegriff *Saccharomyces cerevisiæ*. Wochenschr. f. Brauerei 1894.
- Ueber Melitriose und deren quantitative Bestimmung. Chem. Ztg. 18. 1894.

- BAU, A. — Ueber Schwergärigkeit der Melassen. Z. f. Spiritusindustrie. 1894.
- Ueber das Verhalten von Oberhefe gegenüber Isomaltose und Raffinose. Woch. f. Br. 1894.
 - Etwas über den Nachweis von Unterhefe in oberg. Presshefe. Z. f. Spiritusindustrie. 1894.
 - Prüfung der Presshefe auf eine Beimischung von Unterhefe. Z. f. Spiritusindustrie. 1895.
 - Ueber ein neues Enzym der Hefe. Chem. Ztg. 1895.
 - Ueber die Vergärbarkeit der Galaktose. Z. f. Spiritusindustrie 1896.
 - Ueber Melibiose. Chem. Ztg. 1897.
- BAY, J. CHR. — Sachsia, ein neues Genus der hefenähnlichen nicht sporentragenden Pilze. Ber. d. D. botan. Ges. 1894.
- Is the red Torula a genuine Saccharomyces. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2 Abt. II. 1896.
- BÉCHAMP. — De l'influence de l'oxygène sur la fermentation alcoolique par la levure de bière. — Compt. rend. Ac. sc. LXXXVIII. 1879.
- BECKER, H. — Ein sehr beachtenswertes Ergebnis von vergleich. prakt. Versuchen über Anwendung von Reinhefen. Weinbau u. Weinh. Mayence 1895.
- BEHRENS, J. — Ueber das Erwärmen und das Konservieren des Hopfens. Wochenbl. d. landw. Vereins im Grossh. Bade. 1894.
- Der Ursprung des Trimethylamins im Hopfen und die Selbsterhitzung desselben. Carlsruhe. 1894.
 - Die Beziehungen der Mikroorganismen zum Tabakbau und zur Tabakfermentation. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
 - Die Infektionskrankheiten des Weines. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
 - Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakspflanze. IX. Ueber die Microorganismen des Tabaks nach der Ernte. Landwirtsch. Vers, Stat. XLVI.

- BEHRING. — Ueber Desinfektion, Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. Zeitsch. f. Hygiène, IX. 1891.
- BÉIJERINCK, M. W. — Die Laktase, ein neues Enzym. Centr. f. Bakt. u. Parasit. VI. Bd. 1889.
- Sur le Képhir. Archives néerlandaises des sc. exactes et natur. XXIII. 1889.
 - Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikroben. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. IX. 1891.
 - Ueber Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIV. 1893.
 - Ueber die Butylalkoholgärung und das Butylferment. Verhandl. d. Koninklijke Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam. Sect. II. Deel I. Amsterdam 1893.
 - Schizosaccharomyces octosporus, eine achtsporige Alkoholhefe. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XVI. 1894.
 - Ueber Thermotaxis bei Bacterium Zopfii. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XV. 1894.
 - Ueber Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
 - Over Azijnthergist. Handl. van het Vijfde Nederlandsch Natuur en Geneeskundig Congres. 1895.
 - Ueber die Einrichtung einer normalen Buttersäuregärung. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- БЕЛОУОВЕК, А. — Ueber die Erzeugung von Reiskier. — Bay. Bierbr., 1870.
- Einige Worte über den Bau und die Einrichtung der Brauereien. — Prague, 1875.
 - Studien über Presshefe. — Prague, 1876.
 - Ueber die Erzeugung von Presshefe in Kartoffel-Brennereien. — Oesterreichische Brennereizeitung. 1878.
 - Ueber die Obergärung von Bierwürzen. — Prague, 1881.
 - Ueber den Einfluss der Hefe auf die Qualität des Bieres und über die Bedeutung der reinen Samenhefe für

- die Brauindustrie in Böhmen und Mähren. — Vortrag Böhm. Bierbrauer. Prague, 1883.
- BÉLOHOUBEK, A. — Dr. Emile Chr. Hansen, eine biographische Skizze. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Munich, 1889. (De plus une série de traités sur la fermentation en langue tchèque).
- BERTHELOT. — Sur la fermentation alcoolique. — Ann. de chim. et de phys. L. 1857.
- BIERNACKI, E. — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgärung zu beschleunigen, und übergewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung mit einander. — Pflügers Archiv. XLIX. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich. 1891.
- BILLROTH. — Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica*. 1874.
- BIOURGE, PH. — Les levures. Conférence faite à l'assemblée générale de l'Association, le 13 Novbr. Louvain. 1893.
- BLANKENHORN und MORITZ. — Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Gärung. — Ann. d. Oenologie 1874.
- BOCHICCIO, N. — Contribution à l'étude des fermentations de la lactose. Ann. de micrographie VI. Paris 1894.
- Ueber einen Milchezucker vergärenden und Käseblähungen hervorrufenden neuen Hefenpilz. Centr. f. Bakt. u. Par. XV. 1894.
- BOKORNY, TH. — Beeinflussung der Alkoholgärung durch chemische Substanzen. Allg. Brauer- und Hopfenzeitung. 1896.
- BORDAS. — Sur une maladie nouvelle du vin en Algérie. — Compt. rend. Ac. sc. CVI. 1888.
- BORGSMANN, E. — Zur chemischen Charakteristik durch Reinkulturen erzeugter Biere. — Fresenius, Zeitschrift für analytische Chemie, XXV. 1886.

- BOUFFARD, A. — Sur le cassage des vins. Compt. rend. ac. sc. LXXXVI.
- Détermination de la chaleur dans la fermentation alcoolique. Progrès agricole et viticole. Montpellier 1895.
- BOULLANGER, E. — Action des levures de bière sur le lait. Ann. Inst. Past. XI. 1897.
- BOURQUELOT, E. — Sur les propriétés de l'invertine. — Journ. de pharm. et chim. VII. 1883.
- Sur le non-dédoublement préalable du saccharose et du maltose dans leur fermentation lactique. — Journ. de pharm. et de chim. VIII. 1883.
- Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. — Compt. rend. Ac. d. sc. LXXXVII 1883.
- Rech. sur les propriétés physiologiques du maltose. — Journ. de l'anat. et de la phys. 1886.
- Les microbes de la fermentation lactique du lait. Le Képhir. — Journ. de pharm. et de chim. XIII. 1886.
- Sur les caractères de l'affaiblissement éprouvé par la diatase (amylase) sous l'action de la chaleur. Ann. Inst. Pasteur. I. 1887.
- Sur la fermentation alcoolique du galactose. — Journ. de pharm. et de chim. XVIII. 1888.
- Sur la fermentation alcoolique du galactose. — Compt. rend. Ac. sc. CVI. 1888.
- Les fermentations. — Paris, 1889 et 1893.
- Sur un ferment soluble nouveau dédoublant le tréhalose en glucose. Compt. rend. ac. sc. CXVI. 1893. Compt. rend. soc. de biol. 1893.
- Les ferments solubles de l'*Aspergillus niger*. Bull. soc. Mycologique de France, IX. 1893.
- Remarques sur les ferments solubles sécrétés par l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*. Compt. rend. de la soc. de biol. 1893.
- Inulase et fermentation alcoolique indirecte de l'inuline.

- Compt. rend. ac. sc. CXVI. 1893. Compt. rend. de la soc. de biol. 1893.
- BOURQUELOT, E. — Les ferments solubles (Diastases, enzymes). Paris 1896.
- BOUTROUX. — Sur la fermentation lactique, — Compt. rend. Ac. sc. LXXXVI 1874.
- Sur une fermentation nouvelle du glucose. — Comp. rend. Ac. sc. XCI, 1880.
- Sur l'habitat et la conservation des levures spontanées. — Bull. de la Soc. Linnéenne de Normandie. 3^e sér. VII, 1883.
- Fermentation panaire. — Compt. rend. des. s. de l'Acad. des sc. CXIII. 1891.
- BRAEUTIGAM, W. — Untersuchungen über die Mikroorganismen in Schlempe und Biertrebern. — Inaug.-Diss. Leipsic. 1886.
- BREFELD. — Botan. Untersuchungen über Schimmelpilze. — I-4. Heft. Leipsic, 1872-1881.
- Mucor racemosus und Hefe. — Flora 56. Jahrg. 1873.
- Ueber Gärung I., II., III. — Landw. Jahrbücher III., IV., V., Bd. 1874, 1875, 1876.
- Methoden zur Untersuchung der Pilze. — Ber. d. mediz.-phys. Gesellsch. zu Würzburg. 1874.
- Beobachtungen über die Biologie der Hefe. — Sitzb. d. Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. Bot. Ztg. 1875.
- Botanische Untersuchungen über Hefenpilze (Fortsetzung der Schimmelpilze). Heft. 5. Leipsic, 1883.
- Untersuchungen auf dem Gesamtgebiete der Mycologie. (Fortsetzung der Schimmel- und Hefenpilze). 6-10. Heft. Leipsic, 1884-1891.
- Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mycologie XI. Die Brandpilze II (Fortsetzung des V. Heftes). XII. Fortsetzung der Schimmel- und Hefenpilze. Hemibasidii. Die Brandpilze III (Fortsetzung des V. und VI. Heftes). Münster i. W. 1895.

- BREJCHA. — Mikrosk. Analyse des Kühlgelägers. — Zeitschrift des Brauindustrie-Vereins f. d. K. Böhmen, 1879.
- BROWN, A.-J. — The chemical action of pure cultivations of *Bacterium aceti*. — Journ. Chem. Soc., 1886. Chemical News LIII, 1886.
- On an acetic ferment which forms cellulose. — Journ. Chem. Soc. 1886.
 - Further Notes on the Chemical Action of *Bact. aceti*. Ibid. 1887.
 - Note on the cellulose formed by *Bact. xylinum*. Ibid. 1887.
 - Some expériences on the numerical increase of yeast cells. — Transact. of the Laboratory Club. Vol. III Nr. 4. Londres, 1890.
 - On the influence of oxygen on alcoholic fermentation. — Journ. Chem. Soc. Nr. 107. 1892.
 - The specific character of the fermentative functions of yeast cells. Journ. Chem. Soc. 1894.
 - Note on *Bacillus subtilis*. Journ. federated Inst. of Brewing. I. Londres 1895.
 - On Fermentation. Journ. federat. Inst. of Brewing. Vol III. Londres 1897.
 - Fermentative power. An answer to the criticism by M. E. Duclaux. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2 Abt. III. 1897.
- BROWN, HORACE T., and MORRIS, G. H. — On the non-crystallisable products of the action of diastase upon starch. — Journ. of the Chemical Society, 1885.
- On the « Isomaltose » of Lintner. Journ. Chem. Soc. 1895.
 - On a case of bacterial infection by air-sown organisms. A practical study. Journ. federated Inst. of Brewing. I. Londres 1895.
- BUCHNER, ED. — Ueber den Einfluss des Sauerstoffes auf Gärungen. — Zeitschr. f. phys. Chemie IX. 1885.

- BUCHNER, ED. — Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Ber. d. Deutschen chem. Gesellschaft. XXX. Heft 1.. Heft 9. Berlin 1897.
- BUCHNER, H. — Ueber den Einfluß, des Lichtes auf Bakterien I. Central. f. Bakt. u. Paras. XI-1892. II: Ibid. XII-1892.
- Ueber den Einfluss des Lichtes auf Bakterien und über die Selbst-reinigung der Flüsse. Archiv f. Hygiene. XVII. 1893.
- BUNGENER, H. — La levure de bière. — Moniteur scientifique du Dr Quesneville. Paris, 1890.
- BUNGENER, und WEIBEL. — Einiges über die Zusammensetzung des Würze-Extraktes. — Allg. Brauer und Hopfenzeitung, 1891.
- BUSCALIONI, L. — Il Saccharomyces guttulatus Rob. Giornale Malpighia. X. Gènes 1896.
- BÜSGEN. — Ueber Aspergillus Oryzae. — Botan. Centralblatt. VI., 1885.
- Aspergillus Oryzae. Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. III. Berlin 1885.
- BUSSE. — Ueber Saccharomyces hominis. Archiv für pathol. Anatomie und Physiologie. CXL, 1895. Centralbl. f. Bakt. XVI. 1895.
- CAGNIARD-LATOUR. — Journal de l'Institut. 1835-1837.
- Mémoire sur la fermentation vineuse. — Compt. rend. IV. 1837. Ann. de Chim. et de Phys. LXIII. 1838.
- CALMETTE. — Contribution à l'étude des ferments de l'amidon. — La levure chinoise. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1892.
- CAMBIER, R. — Résistance des germes des bactéries à la chaleur sèche. Ann. de Micrographie. VIII. 1896.
- CAVARA. — Saccharomyces Comesii. Revue mycologique. 1893.
- CAVAZZANI, E. — Zur Kenntniss der diastatischen Wirkung der Bakterien. Centralbl. f. Bakt. u. Paras XIII. 1893.

- CHAPTAL. — L'art de faire le vin. 1807.
- CHICANDART. — La fermentation panaire. — Monit. Scientif. Quesneville. Oct. 1883.
- CHUDIAKOW, N. v. — Untersuchungen über die alkoholische Gärung. Landw. Jahrb. herausg. v. Thiel. XXIII. 1894.
- CIENKOWSKI. — Die Pilze der Kahlhaut. — Bull. d. Petersb. Akademie XVII, 1872 (Mélanges biologiques VIII).
- Zur Morphologie der Bakterien. — Mém. de l'Acad. de St-Pétersbourg. S. VII., T. XXV. 1877.
- Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. — Charkow, 1878.
- CLAUTRIAU, G. — Étude chimique du Glycogène chez les champignons et les levures. Extr. d. Mém. publ. Acad. r. de Belgique. LIII. 1895.
- CLUSZ, A. — Die Reinzuchthefer und die Anwendung der Antiseptica, speziell der Fluorverbindungen, in der Brennerei. Habilitationsschrift. Halle. a. S. 1893.
- Die Anwendung der Flußsäure zur Herstellung einer Hefe ohne Säuerung. Z. f. Spiritusindustrie. 1894.
- Die praktischen Erfolge der Arbeitsweise ohne Säuerungsprozess mit nach Efferont in Flußsäure akklimatisierter Hefe. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. XVIII.
- COHN, F. — Beiträge zur Biologie der Pflanzen. — 1. Bd. 2. H. 1872; 4 Bd. 3. H. 1875; 2. Bd. 2. H. 1876; 2. Bd. 3. H. 1877. (Recherches sur les bactéries).
- Ueber Kephir. — Sitzber. des Schles. Ges. für vaterländ. Kultur. Breslau, 1883.
- Ueber Schimmelpilze als Gärungserreger. — Jahrb. d. Schles. Gesellsch. f. vaterländ. Kultur zu Breslau. LXI., S. 226. 1884.
- Ueber Wärmeerzeugung durch Schimmelpilze und Bakterien. Breslau 1890.
- Ueber thermogene Wirkung von Pilzen. Jahrb. der Schles. Gesellsch. für vaterländ. Kultur. 1890.

- COHN, F. — Ueber thermogene Bakterien. Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. Generalversammlungsheft. 1893.
— Verh. d. Ges. deutscher Naturf. u. Aerzte zu Nürnberg II. Hälfte 1.
- Ueber Formaldehyd und seine Wirkung auf Bakterien. Sitzungsber. der botan. Sekt. der Schles. Gesellsch. f. vaterländ. Kultur 1893.
- CONN, H. W. — Ueber einen bittere Milch erzeugenden Mikrokokkus. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. IX. 1891.
- Isolierung eines « Lab »-Fermentes aus Bakterienkulturen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XII. 1892.
- Cream ripening with Bacillus No. 41. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
- Bacteria in the Dairy. (VIII. Cream Ripening with pure cultures of Bacteria). Ann. Report of the Storrs Agricult. Exp. Station. VII.
- The Relation of Pure Cultures to the Acid. Flavor and Aroma of Butter. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- CORNU, M. — Le Mildew, Peronospora des vignes (*P. viticola* Berk.). Compt. rend. ac. d. sc. LXXXXI. 1880.
- CORSELLI E FRISCO. — Blastomycètes pathogènes chez l'homme. Annali d'Igiene speriment. V.
- CRAMER, C. — Untersuchung über das Zäherwerden des Weines. Weinbau u. Weinh. 1890.
- CRAMER, E. — Die Ursache der Resistenz der Sporen gegen trockene Hitze. Archiv für Hygiene. XIII. 1891.
- Die Zusammensetzung der Sporen von *Penicillium glaucum* und ihre Beziehung zu der Widerstandsfähigkeit derselben gegen aussere Einflüsse. Archiv für Hygiene. XX. 1894.
- CREMER, M. — Demonstration des Hefeglykogens in den Zellen und als Präparat. Münchener medic. Wochenschrift. 1894. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphologie u. Phys. zu München 1894.
- Ueber die Umlagerung der Zuckerarten unter dem

- Einflüsse von Ferment und Zelle; ein Beitrag zur Lehre von der Glykogenie und Gärung. Z. f. Biologie. XXXI. 1894.
- CUBONI, G. E PIZZIGONI, A. — Contribuzione allo studio dei fermenti del vino. Staz. sperim. agrar. ital. XXV. 1893.
- CURCI, V. — Estudio sobre un nuevo fermento butyrico. Ann. d. Museo nacional de Montevideo. VII. 1896.
- CUSMANO, G. — L'acido carbonico migliora e conserva i vini. Miland 1894.
- CURTIS, F. — Contribution à l'étude de la Saccharomycose humaine. Ann. Inst. Pasteur. X. 1896.
- DANGEARD, A. — Contribution à l'étude des bactéries vertes. Comp. rend. ac. sc. CXII. 1891. Le Botaniste, sér. II. 1891.
- Sur la structure histologique des levures et leur développement. Compt. rend. ac. sc. CXVII. Paris 1893.
- Observations sur le groupe de bactéries vertes. Ann. de Micrographie. VII. 1895.
- DAVID. — Ueber Rotweingärungspilze. — Ann. d. Oenologie. IV. 1874.
- DELBRUCK. M. — Die Säuerung des Hefengutes. — Zeitschr. f. Spiritusindustrie, 1881.
- Der Charakter des Bieres, auch des Weissbieres. Woch. f. Brauerei. Berlin, 1885.
- Die Carlsberger reingezüchtete Hefe. — Ibid. 1885.
- Zur Wirkung der Kohlensäure-Entwicklung auf die Gärung. — Ibid. 1886.
- Die Reinzuchtheffe und die Presshefefabrikation. — Zeitschr. f. Spiritusindustrie. Berlin, 1889.
- Die Erfolge der Reinheffe in der Praxis und die Bekämpfung der Schaumgärung. Z. f. Spiritusind. Ergänzungsheft. 1893.

- DELBRUCK, M. — Natürliche Hefereinzucht. Wochenschr. f. Brauerei. Berlin. XII. 1893.
- Die natürliche Reinzucht in der Praxis. Vortrag. Wochenschr. f. Brauerei. XII. 1893.
- DONATH. — Ueber den invertierenden Bestandteil der Hefe. — Ber. d. deutsch. chem. Ges. VIII., 1875.
- DOWDESWELL. — On the occurrence of variations in the development of a Saccharomyces. Journ. Roy. Microsc. Soc. — Ser. II., vol. V. Londres, 1885.
- DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. — Ann. de l'Institut agronomique, 1882.
- Chimie biologique (Microbiologie). Paris, 1883-1898.
- Fermentation alcoolique du sucre de lait. — Ann. de l'Inst. Pasteur. 1887.
- Sur la conservation des microbes. Ibid. III. 1889.
- Sur la conservation des levures. Ibid. III. 1889.
- Note sur la formation des spores dans la levure. Ibid. III. 1889.
- Sur les analogies entre les procès de la fermentation et de la combustion solaire. Ibid. VII. 1893.
- Principes de laiterie. Paris 1893.
- Le lait, étude chimique et microbiologique. Paris. 1894.
- Le pouvoir ferment et l'activité d'une levure. Ann. Inst. Pasteur. X. 1896.
- DÜLL, G. — Zur Kenntniss des Bierextractes. Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Vienne 1892.
- DÜNNEBERGER, C. — Bakteriologisch-chemische Untersuchung über die beim Aufgehen des Brotteiges wirkenden Ursachen. — Botan. Centralblatt. Bd. 33. 1888.
- DURST, O. — Handbuch der Presshefefabrikation. Berlin, 1896.
- ECKENROTH und HEIMANN. — Ueber Hefe und Schimmelpilze an den Trauben. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2. Abt. I. 1895.

- EFFRONT, J. — De l'influence des fluorures sur l'accroissement et le développement des cellules de levures alcooliques. *Moniteur scientifique*. 1891.
- Étude sur les levures. *Moniteur scientifique*. 1891.
- Influence de l'acide fluorhydrique et des fluorures sur l'activité de la levure. *Bull. soc. chim.* V. 1891.
- Action de l'acide fluorhydrique et des fluorures dans la fermentation des matières amylacées. *Bull. soc. chim.* V. 1891.
- Accoutumance des ferments aux antiseptiques et influence de cette accoutumance sur leur travail chimique. *Compt. rend. ac. d. sc.* CXIX. 1894.
- Étude sur le levain lactique. *Ann. Inst. Pasteur.* X. 1896.
- EHRENBERG. — *Epistola de Mycetogenesi.* — *Nov. act. Acad. nat.* 1821.
- EHRlich, F. — *Eignet sich Formaldehyd zur Konservierung von Nahrungsmitteln.* Inaug.-Diss. Wurtzbourg. 1895.
- EIDAM. — *Der gegenwärtige Standpunkt der Mykologie* — 1871-1872.
- EIJKMAN, C. — *Mikrobiologisches über die Arrakfabrikation in Batavia.* *Centr. f. Bakt. u. Par.* XVI. 1894.
- EISENSCHITZ, S. — *Beiträge zur Morphologie der Sprosspilze.* Inaug.-Diss. Vienne 1895.
- *Ueber die Granulierung der Hefezellen.* *Centr. f. Bakt. u. Paras.* 2 Abt. I. 1895.
- ENGEL. — *Les ferments alcooliques.* — Thèse pour le Doct. ès. sc. nat. 1872.
- ELION, H. — *Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung von Würze und Bier.* — *Zeitschr. f. angew. Chemie.* Heft. II. 1890.
- *Die Bestimmung von Maltose, Dextrose und Dextrin in Bierwürze und Bier mittelst Reinkulturen von Mikroorganismen.* — *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* IX. 1891.

- ELION H. — Studien über Hefe. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIV. 1893.
- ESSAULOF, N. — Ueber Kefir, eine bakt. und chem. Untersuchung. (Inaug.-Diss). Moscour 1895. (Ref. Molkereizeit. 1895)
- FELLOWES, F. W. — Some of the micro-organisms causing the discases of beer. Trans. of the North of England, Institute of Techn. Brew. III. Manchester. 1894.
- FERMI, G. — Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversionsfermente. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XII. 1892.
- und PERNOSI. — Ueber die Enzyme. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. (Autoref. im Centralbl. f. Bakt. XV, 1894). XVIII. 1894.
- und MONTESANO. — Ueber die Dekomposition des Amygdalins durch Mikroorganismen. Centr. f. Bakt. u. Paras. XV. 1894.
- und ARUCH. — Ueber eine neue pathogene Hefenart. Centralbl. f. Bakt. XVII 1895.
- und MONTESANO. — Die von den Mikroben bedingte Inversion des Rohrzuckers. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2. Abt. I. 1895.
- E POMPONI. — Ricerche biologiche sui Saccharomyceli ed Oidi. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2. Abt. II. 1896.
- FERNBACH, A. — Note sur le dosage de la sucrase. — Ann. de l'Inst. Pasteur, III, 1889.
- Sur le dosage de la sucrase. Ann. Inst. Past. III. 1889.
- Sur le dosage de la sucrase. Formation de la sucrase chez *Aspergillus niger*. Ann. de l'Inst. Past. IV. 1890.
- Sur l'invertine ou sucrase de la levure. — Ann. del'Inst. Pasteur, IV. 1890.
- FISCHER, B. — Ueber einen neuen bei Kahmhautpilzen beobachte-

- ten Fortpflanzungsmodus. Centralbl. f. Bact. u. Paras. XIV. 1893.
- FISCHER, B. und BREBECK, C. — Zur Morphologie, Biologie und Systematik der Kahmpilze, *Monilia candida* Hansen und des Soorerregers. Jéna 1894.
- FISCHER, E. — Reduktion von Säuren der Zuckergruppe. Ber. d. D. chem. Gesellsch. XXII.
- Die Chemie der Kohlehydrate und ihre Bedeutung für die Physiologie. Rede geh. z. Feier des Stiftungstages d. militararzl. Bildungsanstalten am 2. Aug. 1894. Berlin (Hirschwald) 1894.
- und THERFELDER, H. — Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen. Ber. d. D. chem. Ges. XXVII. 1894.
- Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. Berichte d. Deutschen chem. Gesellschaft. XXVII. 1894. XXVIII. 1895.
- und LINDNER, P. — Ueber die Enzyme von *Schizosaccharomyces octosporus* und *Saccharomyces Marxianus*. Ber. d. Deutschen chem. Gesellschaft. XXVIII. 1895.
- FISCHER, E. und LINDNER, P. — Ueber die Enzyme einiger Hefen. Ber. d. D. chem. Ges. XXVIII. 1895.
- Ueber Enzyme einiger Hefen. Wochenschr. f. Brauerei 1895.
- FISCHER, E. — Ueber die Isomaltose. Ber. d. d. chem. Gesellsch. XXVIII. 1895.
- FISCHER, P. — Pure yeast culture in pract. use in large breweries. With special reference to the plant of the Pabst Brewing Co. The American Brewer. Nr. 9. 1895.
- FITZ. — Ueber die alkoholische Gärung durch *Mucor Mucedo* und *M. racemosus*. — Ber. d. deutschen chem. Ges. VI.. 1873, et VIII, 1875.
- Ueber Schizomyceten-Gärungen. — Ber. d. deutschen chem. Gesellsch. IX-XVII. 1876-1884.
- FLÜGGE. — Die Mikroorganismen. — Leipsic, 1886.

- FLÜHLER, A. — Conférence faite à la Société des sciences industr. de Lyon. — Section de chimie, 1886.
- FOKKER, A. P. — Ueber das Milchsäureferment. — Fortschr. der Medizin. Nr. 11, 1839.
- Ueber das Milchsäureferment. — Centrabl. f. Bakt. u. Parasitenk. VI. 1889.
- Onderzoekingen omtrent melkzuurgisting. — Ned. Tijdschr. v. Geneesk 1890.
- Onderzoekingen over melkzuurgisting. — Weekblad van het Ned. Tijdschr. v. Geneesk. k. Nr. 4 en Nr. 19. 1890.
- FORTI, C. — Contribuzione alla conoscenza dei lieviti di vino. — Le stazioni sperimentali agrarie Italiane. Vol. XXI. fasc. III, 1891.
- Sull' impiego dei fermenti selezionati puri. Staz. speriment. ital. XXI. 1891.
- Retazione intorno agli studi zimoteecnici. Bolletino di Notizie agrarie. Direzione generale dell'agricoltura. Rome (Nr. 42). 1893.
- I. Relazione intorno agli esperimenti di centrifugazione di mosti d'uva e di vinificazione con aggiunta di fermenti coltivati, eseguiti presso la fondazione per l'istruzione agraria in Perugia.
- II. Relazione degli studi fatta sui fermenti di vini. Bolletino di Notizie agrarie (Ministero di agricoltura). Rome 1896.
- Expériences de turbinage du moût de raisin, et de vinification avec addition de levures pures. Bolletino di notizie agrarie. Nr. 37. Rome 1896.
- FOTH, G. — Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. — Wochenschr. f. Brauerei. p. 73 et p. 305. Berlin, 1887.
- FOTH, G. — Ueber den Einfluss der Kohlensäure auf das Wachstum und die Gärthätigkeit der Hefe und ihre Bedeutung für die Konservierung des Bieres. — Woch. f. Br., p. 264, Berlin 1889.

- FRAENKEL, C. — Grundriss der Bakterienkunde. — 3 Aufl. Berlin, 1890.
- FRANKLAND, P. F. — New method for determining the number of microorganisms in air. — Proc. Roy. Soc. XLI., p. 443.
- Filtration of the air. — Philos. trans. of the Roy. Soc. Vol. 178, p. 413, 1887.
- and Fox, J. J. — On a pure fermentation of mannite and glycerine. (*B. ethaceticus*). Proc. Roy. Soc., Londres. Vol. XLVI, 1889.
- Micro-organisms in their relation to chemical change. — Roy. Inst. of Great Britain. Meeting Feb. 19, 1892.
- and MAC GRÉGOR. — Fermentation of Arabinose with the *Bacillus ethaceticus*. — Trans. Chem. Soc., 1892, p. 437.
- and LUMSDEN. — Decomposition of Mannite and Dextrose by the *Bacillus ethaceticus*. — Trans. Chem. Soc., 1892, p. 432.
- Sarcolactic Acid obtained by the Fermentation of inactive Lactic Acid. Transact. Chem. Soc. 1893.
- FRANKLAND, P. — Bacteriology in its Relations to Chemical Science. Read at the British Association for the Advancement of Science. Sept. 1893.
- P. and Mrs. P. — Micro-organisms in water; their significance, identification and removal. Londres 1894.
- FRENZEL, J. — Ueber den Bau und die Sporenbildung grüner Kaulquappen-bacillen. Zeitschr. f. Hygiene. XI. 1891.
- FRESENIUS. — Beiträge zur Mycologie. 1850-63.
- FREUDENREICH, E. VON. — Bakteriologische Untersuchungen über den Reifungsprozess des Emmenthaler Käses. Landwirthsch. Jahrb. der Schweiz. 1891.
- De la perméabilité des filtres Chamberland à l'égard des Bactéries. Ann. de micrographie. IV. 1891-92.

- FREUDENREICH.—Ueber die Durchlässigkeit der Chamberlandfilter für Bakterien. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* XII. 1892.
- Les microbes et leur rôle dans la laiterie. Paris. 1893.
- Ueber den jetzigen Stand der bakteriologischen Forschung auf dem Gebiete des Käseereifungsprozesses. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. I. 1895.
- Contribution à l'étude des causes de l'amertume des fromages et du lait. *Ann. de micrographie.* VII. 1895.
- Bemerkungen zu Dr. Weigmanns Mitteilung über den jetzigen Stand der bakteriologischen Forschung auf dem Gebiete des Käseereifungsprozesses. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. II. 1896.
- Bakteriologische Untersuchungen über den Kefir. *Centr. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. III. 1897.
- Ueber die Erreger der Reifung bei dem Emmenthaler Käse. *Centr. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. III. 1897.
- FREUND, P. — Die Reinzuchtheefe und der Geschmack des Bieres. — *Oesterr. Brauer — und Hopfen — Zeitung*, 1890.
- FRIEDLANDER. — *Mikroskopische Technik*. Fünfte Aufl. Bearb. v. Eberth. Berlin, 1894.
- GARNIER, LÉON. — *Ferments et Fermentations*. Paris 1888.
- GAYON. — Faits pour servir à l'histoire physiologique des moisissures. — *Mém. de la Soc. des sciences phys. et naturelles de Bordeaux*, 1878.
- Sur la fermentation produite par le *Mucor circinelloides* — *Ann. de Chim. et de phys.* XIV. p. 258. 1878.
- Sur l'inversion et sur la fermentation du sucre de canne par les moisissures. — *Bull. Soc. Chim.* XXXI, p. 139, 1879.
- Sur un procédé nouveau d'extraction du sucre des mélasses. *Ann. agronomique*. 1880.

- GAYON. — Notes sur l'emploi des levures sélectionnées dans la fermentation de moûts de raisins et sur la pasteurisation des vins nouveaux. (Soc. d'agric. de la Gironde. 1893). Bordeaux 1894.
- GAYON et DUBOURG. — Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniments petits. — Nancy, 1886.
- De la fermentation de la dextrine et de l'amidon par les Mucors. — Ann. de l'Inst. Pasteur. I. 1887.
- et DUBOURG. — Sur la fermentation alcoolique du sucre interverti. — Compt. rend. de l'Académie. des. Sc. CX. p. 865. Paris, 1890.
- Sur les vins mannités. Ann. Inst. Pasteur VIII. 1894.
- et DUPETIT. — Sur un moyen nouveau d'empêcher les fermentations secondaires. — Compt. rend. ac. sc. 1886.
- GÉRARD, E. — Présence dans la *Penicillium glaucum* d'un ferment agissant comme l'émulsine. Compt. rend. de la soc. de biolog. 1893.
- GILTAY, E. und ABERSON, J. — Ueber den Einfluss des Sauerstoffzutritts auf Alkohol- und Kohlensäurebildung bei der alkoholischen Gärung. Pringsh. Jahrbücher. XXVI. 1894.
- GIUNTI, M. — Sur l'effet de la lumière sur la fermentation acétique. — Le Stat. speriment. Agrar. Ital. XVIII. Fasc. II
- GOETHE, R. — Bericht der Königl. Lehranstalt für Obst- und Weinbau zu Geisenheim a. Rh. Wiesbaden 1893. (Anwendung von reingezüchteten Weinhefen bei der Obstweingärung).
- Bericht der königl. Lehranstalt für Obst-, Wein-, und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh. für das Etatsjahr 1893/94. Wiesbaden 1894.
- GOLDEN, K. E. — Fermentation of bread. — Botan. Gaz., p. 204. 1890.
- GOSIO. — Ueber Links-Milchsäure bildende Vibrionen. Aus dem

- hygienischen Institute der Universität Berlin. Archiv. f. Hygiene. XXI. 1894.
- GRAWITZ. — Beiträge zur systematischen Botanik der pflanzlichen Parasiten mit experimentellen Untersuchungen über die durch sie bedingten Krankheiten. — Virchows Archiv. B. 70. 1877.
- GREG, PERCIVAL. — Fermentation in rum distilleries. The Sugar Cane. XXV. 1893.
- A contribution to the study of the production of the aroma in rum. I. Bullet. of the Botanic. Departm. Jamaica. Vol. II. part. 8. Kingston, Jamaica. 1895.
 - The Jamaica yeasts. Ibid.
 - A contrib. to the study of the prod. of the aroma in rum. II. Ibid. Vol. II. part. 9. 1895.
 - Selected yeasts and general considerations. Ibid. Vol. II. part. 11. 1895.
 - A contrib. to the study of the prod. of the aroma in rum. III. Ibid. Vol. III. part 1. 1896.
- GRIESSMAYER. — Hansen als Reformator der Gärungsindustrie. — Allg. Brauer- und Hopfenzeit. Nuremberg. 1890.
- GRÖNLUND. — Ueber Organismen in der Kühlschiffwürze. — Allg. Zeits. f. Bierbr. u. Malzfabr. Vienne, 1883.
- Ueber bitteren, unangenehmen Beigeschmack des Bieres. Z. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1887.
 - En ny Torula-Art og to nye Saccharomyces-Arter. Vidensk. Med. fra den Naturhist. Foren. Copenhagen 1892.
- GROTENFELT, G. — Studien über die Zersetzung der Milch. — II. Ueber die Virulenz einiger Milchsäurebakterien III. Ueber die Spaltung von Milchzucker durch Sprosspilze und über schwarzen Käse. — Fortschr. der Medicin. Nr. 4. 1889.
- GRUBER, M. — Eine Methode der Kultur anaërobischer Bakterien, nebst Bemerkungen zur Morphologie der Butter-säuregärung. — Cent. f. Bakteriologie, I. 1887.

- GRUBER, M. — Ueber die Methoden der Prüfung der Desinfections-
mittel. VII. intern. Congr. f. hygiene and demo-
graphy. London, 1891. — Centr. f. Bakt. u. Parasi-
tenk XI. B., p. 115. 1892.
- Gesichtspunkte für die Prüfung und Beurteilung von
Wasserfiltern. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIV.
1893.
- GRUBER, TH. — Die Arten der Gattung Sarcina. Arb. a. d.
Bakt. Inst. d. Techn. Hochschule zu Karlsruhe. I.
1895.
- GUICHARD, P. — Composition et analyse de la levure. Bull.
de la soc. chim. de Paris. sér. III. T. XI. 1894.
- GUILLEBEAU, A. — Beiträge zur Lehre von den Ursachen der
fadenziehenden Milch. Landw. Jahrbücher der
Schweitz. 1891.
- Description de deux nouveaux microbes du lait filant.
Ann. de micrographie. IV. 1891—92.
- GUILLEMIN. — Étude sur le vinaigre. Joinville. 1891.
- GÜNTHER U. THIERFELDER. — Bakteriologische und chemische
Untersuchungen über die spontane Milchgerinnung.
Arch. f. Hygiene. XXV.
- HABERLANDT. — Das Vorkommen und die Entwicklung der
sogenannten Milchsäurehefe. — Wissensch.-prakt.
Untersuchungen auf dem Gebiete des Pflanzenbaues.
1875.
- HAGEN-SCHOW. — Pure yeast and fermentation. Transact. of
the Lab. Club. Vol. III. Londres 1890.
- HALLIER, E. — Die Hefe der Alkoholgärung, insbesondere der
Biergärung. Weimar. 1896.
- HAMMARSTEN, O. — Ueber Kephir. Molkerei-Ztg. II. Agricult.
Centralbl. XVII.
- HANSEN, E. CHR. Les champignons stercoraires du Danemark. —
Résumé d'ua mémoire publié dans les « Videnskbl
Meddelelser » de la Société d'histoire naturelle de
Copenhague 1876.

- HANSEN E. CHR. — Contributions à la connaissance des organismes qui peuvent se trouver dans la bière et le moût de bière et y vivre. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laboratori et. Copenhague. I. vol., 2. liv. 1879 (1).
- Oidium lactis. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. vol., 2. liv. 1879.
- Saccharomyces colorés en rouge et cellules rouges ressemblant à des Saccharomyces. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. vol. 2. liv. 1879.
- Sur l'influence que l'introduction de l'air atmosphérique dans le moût qui fermente exerce sur la fermentation. Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. vol., 2. liv. 1879.
- Hypothèse de Horvath. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. vol., 2. liv. 1879.
- Mycoderma aceti (Kütz). Pasteur et Myc. Pasteurianum nov. sp. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. vol., 2. liv. 1879.
- Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. I. vol., 3. liv. 1881.
- Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. I. Sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. I. vol., 3. liv. 1881.
- Recherches sur les organismes qui, à différentes époques de l'année, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière (II). — Compt. rend. des Meddel. fra. Carlsb. Laborat. I. vol., 4. liv. 1882.
- Recherches sur la physiol. et la morphol. des ferments alcooliques. II. Les ascospores chez le genre Saccha-

(1) Tous les Comptes rendus du Laboratoire Carlsberg se vendent chez M. H. Hagerup, libraire à Copenhague.

- romyces. III. Sur les Torulas de M. Pasteur. IV. Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Lab. II. vol., 2. liv. 1884.
- HANSEN. — Bemerkungen über Hefenpilze. — Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabrikation. 1883.
- Neue Untersuchungen über Alkoholgärungspilze (Monilia). — Berichte d. deutschen botan. Gesellsch. 1884.
 - Ueber Wiesners neue Prüfungsmethode der Presshefe. — Dinglers Polytechn. Journal. P. 419. 1884.
 - Einige kritische Bemerkungen über Dr. Hueppes Buch: « Die Methoden der Bakterienforschung ». — Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. und mikroskopische Technik. Bd. II. 1885.
 - Vorläufige Mitteilungen über Gärungspilze. (Gelatin. Netzwerk. — Scheidewandbildung. — Sacch. apiculatus). — Botan. Centralblatt. Bd. XXI., Nr. 6 1885.
 - Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. V. Méthodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues. VI. Les voiles chez le genre Saccharomyces. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laboratoriet II. vol., 4. liv. 1886.
 - Ueber Hefe und Hefereinzucht. Vortrag in der Generalversamml. der Oesterr. Brauerbundes Graz 1887. Zeitschr. f. Brauerei. u. Malzf., Vienne 1887. (Compt. rend. dans le Centralblatt. f. Bakteriologie, u. Par. p. 118, 1887).
 - Uber rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. — Allg. Brauer und Bopfenzeitung. Nr. 95. Nuremberg. 1887.
 - Noch ein Wort über den Einfluss des Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 13. S. 304. Munich, 1887.

- HANSEN. — Neue Bemerkungen zu Foths Abhandlung : « Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. » — Wochenschr. f. Brauerei. S. 378. Berlin, 1887.
- Methode zur Analyse des Brauwassers in Rücksicht auf Mikroorganismen. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen Nr. 1. Munich, 1888.
- Ueber die zymotechnische Analyse der Mikroorganismen der Luft. — Prager Brauer und Hopfenzeitung. Nr. 19. Prague, 1888.
- Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. — Beiträge zur Lebensgeschichte der Mikroorganismen. (1. Heft. Munich (Oldenbourgs Verlag) 1888. Zweite Ausg., 1890. Dvritte Ausgabo 1895.
- Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laborat. II. vol. 5. liv. 1888.
- Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. (Contributions à la biologie des microorganismes.) I. Introduction. II. Culture pure de la levure au service de l'industrie. III. Observations faites sur les levures de bière. VI. Sur l'examen pratique, au point de vue de la conservation de la bière contenue dans les tonneaux des caves de garde. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. II vol., 5. liv. 1888.
- Über die im Schleimflüsse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. — Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenk. V. Bd., p. 532. 1889.
- Some points in connexion with practical brewing: I. On the bacteriological analysis of the water and the air for brewing purposes. II. On my system of pure yeast culture and its application in breweries with top fermentation. — Trans. of. the Laboratory Club Londres 1889.

- HANSEN. — Production des variétés chez les Saccharomyces. Ann. de micrographie. P. Miquel. T. II., Nr. 5. p. 214. Paris 1890.
- Ueber die Pilzstudien in der Zymotechnik. Mit besonderer Rücksicht auf Prof. Dr. Zopf. neues Werk: « Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung » — (Breslau, 1890). Zeitschr. f. d. ges. Brauw. N° 16. Munich, 1890.
- Nouvelles recherches sur la circulation du Saccharomyces apiculatus dans la nature. — Ann. d. sc. nat. Botanique. VII. série. T. XI. Nr. 3, p. 183. 1890. Ann. de Microg. Paris, 1890.
- Qu'est-ce que la levure pure de M. Pasteur? Uue recherche expérimentale. — Compt. rend. d. Meddel. fra Carlsb. Lab. III. vol., I. liv. 1891.
- Recherches sur la physiologie et morphologie des ferments alcooliques. VIII. Sur la germination des spores chez les Saccharomyces. — Compt. rend. d. Meddel. f. Carlsb. Lab. III. vol., I. liv., 1891.
- Neue Untersuchungen über den Einfluss, welchen eine Behandlung mit Weinsäure auf die Brauereihefe ausübt. — Zeitschr. f. d. ges. Bauwesen. Nr. I. Munich. 1892.
- Kritische Untersuchungen über einige von Ludwig und Brefeld beschriebene Oidium und Hefeformen. — Botan. Zeit. Nr. 19. 1892.
- Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. (Contribution à la biologie des microorganismes). V. Sur l'analyse zymotechnique des microorganismes de l'air et de l'eau. VI. Nouvelles recherches sur les maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques (Deuxième mémoire). VII. Sur l'extension actuelle de mon système de culture pure de la levure. Compt. rend. d. Medd. fra. Carlsb. Lab. III. vol., 2. liv. 1892.

- HANSEN. — Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. (Beiträge zur Lebensgeschichte der Mikroorganismen). — II. Heft. Munich. (Oldenbourg's Verl.) 1892.
- Ueber die neuen Versuche, das Genus *Saccharomyces* zuzustreichen. — Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIII. B. Nr. 1. 1893.
- Botanische Untersuchungen über Essigsäurebakterien. Berichte der deutschen botan. Gesellschaft. 1893.
- Recherches sur les bactéries acétifiantes (Second mémoire). Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laborat. III. vol. 3. liv. 1894.
- Experimental studies on the variation of yeast cells. Read before the Botanical section of the British association. Ipswich, Spt. 13. 1895. Annals of Botany. IX. 1895.
- Anlässlich Juhler's Mitteilung über einen *Saccharomyces* bildenden *Aspergillus*. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
- Ueber künstliche und natürliche Hefereinzucht. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen XVIII. 1895.
- Practical studies in Fermentation, being Contributions to the Life History of Micro organisms. Transl. by Alex. K. Miller. Londres. E. et F. N. Spon. 1896.
- Biolog. Untersuch. über Mist bewohnende Pilze. Bot. Ztg. 1897.
- HAPP, C. — Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die schleimige Gärung. Bäle. 1893.
- HARZ. — Unters. über die Alkohol- und Milchsäuregärung. — Z. d. Allg. Oesterr. Apotheker-Vereins. 1870-71.
- Grundzüge der alkoholischen Gärung. — Munich, 1877.
- HAUTEFEUILLE ET PERRY. — Contribution à l'étude des levures. Compt. rend. ac. sc. CXVIII 1894.

- HAYDUCK. — Ueber die Existenz von Hefenrassen mit konstant sich erhaltenden Eigenschaften. — Wochenschr. f. Brauerei, Nr. 20. Berlin, 1885.
- Ueber Milchsäuregärung. — Wochenschr. f. Br., Nr. 17. Berlin, 1887.
- HEDIN, S. G. — Om bestämning af drufsoker genom förfäsnings och uppmätning af kolsyrans volym. — Lunds Univers. Aersskrift T. XXVII. 1891.
- HEINZELMANN, G. — Die Reinzuchthefer in der Brennerel. Zeitschr. für Spiritusindustrie. XV. Jahrg. Nr. 25. 1892.
- HENNEBERG, W. — Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien. Centr. f. Bakt. 2. Abt. III. Bd. 1897.
- HESSE. — Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen. — Mitteil. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. II. 1884.
- HEST, J. J. VAN. — Bakterienluftfilter und Bakterienluft-Filterverschluss. Iéna 1895.
- HIEPE, W. L. — On some Products of Starch Transformation. The Country Brewer's Gazette. Londres 1893-94.
- On fractional fermentation of cane-sugar with pure yeasts. Journ. of the federated Inst. of Brew. 1, 3. Londres 1893.
- HIERONYMUS, G. — Ueber die Organisation der Hefezellen. Ber. d. d. botan. Gesellschaft. 1893.
- HIRSCHFELD, E. — Ueber die Einwirkung des künstl. Magensaftes auf Essigsäure- und Milchsäuregärung. Pflüges's Arch. f. d. ges. Physiologie. XLVII. p. 510. 1890.
- HITCHCOCK. — Studies of atmospheric dust. — Americ. monthly microscop. Journal, 1. 1880.
- HOLDERER. — Le pouvoir ferment et l'activité de la levure. Le Bière et les boissons fermentées. Paris 1897.
- HOLM, J. CHR. — Aeltere und neuere Ansichten über Oberhefe und Unterhefe. — Deutscher Brauer- und Mälzer-Kalender. 1886-87.

- HOLM, J. CHR. — Die Vorrichtungen in der Brauerei zur Kühlung und Lüftung der Würze. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 20. Munich. 1887.
- Bemerkung zu Foths Abhandlung über den Einfluss der Kohlensäure auf die Gärthätigkeit der Hefe. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. p. 301. Nr. 15. Munich. 1889.
 - Sur les méthodes de culture pure et spécialement sur la culture de plaques de Koch et la limite des erreurs de cette méthode. — Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. vol. III., liv. 1. 1891.
 - Ueber die Methoden der Reinkultur und im besonderen über die Plattenkultur von Koch und über die Fehlergrenze dieser Methode. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. p. 438. Munich, 1891.
 - Analyses biologiques et zymotechniques de l'eau destinée aux brasseries. — Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. III. vol., 2. liv. 1892.
 - Einige Bemerkungen anlässlich der Mitteilung P. Lindners über das Wachstum der Hefen auf festen Nährboden. Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen. XVI. 1893.
 - Ueber die Aufbewahrung der Hefe in Saccharoselösung. Centr. f. Bakt. u. Par. 2. Abt. II. 1896.
 - s. Jörgensen.
- HOLM et POULSEN. — Jusqu'à qu'elle limite peut-on, par la méthode de M. Hansen, constater une infection de « levure sauvage » dans une masse de levure basse de *Saccharomyces cerevisiæ*? — Comp. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. II. vol., 4. liv. 1886.
- Jusqu'à quelle limite, etc. Deuxième Communicat. — Comp. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. II. vol., 5. liv. 1888.
- HOLST, A. — Oversigt over Bakteriologien for læger og studerende. — Christiania, 1890.

- HOLZNER. — Ueber Trübung des Bieres. Der Bayerische Bierbrauer. p. 14. 1871.
- Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1877. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. p. 142. 1878.
- HORVATH. — Ueber den Einfluss der Ruhe und der Bewegung auf das Leben. — Pflügers Archiv. für die gesamte Physiologie, Bd. 17. 1878.
- HOTTER, E. — Versuche und Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Weinhefen auf die Vergärung des Apfelmestes. Versuch über den Einfluss der obergarigen Hefe und untergarigen Bierhefe auf die Vergärung des Apfelmestes. Jahresber. d. Obstbauvereins für Mittelsteiermark f. d. J. 1893. Gratz 1894.
- Die Verbesserung der Weine durch reingezüchtete Weinhefen. Gratz 1894. Mitteilungen a. d. Pomolog. Versuchsst. Gratz 1894.
- HUEPPE, F. — Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen. Zur Geschichte der Milchsäuregärung. — Mitt. a. d. K. Gesundheitsamte. Bd. II. 1884.
- Die Methoden der Bakterienforschung. 1891.
- HULLE, L. v. D. und LAER, H. v. — Nouvelles recherches sur les bières Bruxelloises à fermentation dite spontanée. — Mém. cour. et autres mém. publiés par l'Ac. Royale de Belgique. Bruxelles, 1891.
- IKUTA, M. — Die Saké-Brauerei in Japan. — Chemikerzeit. Nr. 27. 1890.
- IRMISCH, M. — Der Vergärungsgrad, zugleich Studien über zwei Hefecharaktere. — Wochenschr. f. Brauerei. Nr. 39—46. Berlin. 1891.
- IWANOWSKI, D. — Recherches sur la fermentation alcoolique (en russe). St. Pétersbourg. 1894. (Rapport Botan. Centralbl. Nr. 23. 1893 ; Nr. 10, 1894, Nr. 5, 1896).
- Ueber die Wirkung des Sauerstoffs auf die alkoholische

- Garung. Mélanges biologiques tirés du bullet. de l'Acad. de St. Pétersbourg. T. XIII. 1894. (Traduction en allemand de la première partie du traité russe qui vient d'être cité).
- JACOBSEN, J. C. — Ueber die Carlsberger reingezüchtete Hefe. — Wochenschr. für Brauerei Nr. 10. Berlin, 1885.
- JAGO WILLIAM. — A Text-book of the science and art of bread-making. Londres 1895.
- JANSSENS, F. A. — Beiträge zu der Frage über den Kern der Hefezelle. — Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIII. B., Nr. 20. 1893.
- JAQUEMIN, G. — Du *Saccharomyces ellipsoideus* et de ses applications industrielles à la fabrication d'un vin d'orge. — Compt. rend. Ac. sc. CVI. Nr. 10. 1888.
- JENSEN, C. O. — Bakteriologiske Undersøgelser over visse Mælke-og Smørfejl. — (Recherches bactériologiques sur certains défauts du beurre et du lait). 22. Comp. rend. du laboratoire agricole royal de Copenhague 1891.
- JODLBAUER, M. Ueber die Anwendbarkeit der alkoholischen Gärung zur Zuckerbestimmung. — Z. f. Rübenzuckerindustrie. Nr. 15. 1888.
- JOERGENSEN, Alfred. — Zur Analyse der Presshefe. — Dinglers polytechn. Journal. Bd. 252, S. 424. 1884.
- Ueber das Verhältnis der Alkohol-Fermentorganismen gegenüber der Saccharose. — All. Br. u. Hopfzfg. Nr. 20. Nuremberg. 1885.
- Gibt es verschiedene Rassen der sogenannten *Saccharomyces cerevisiæ*? — Ibid., 1885, Festummer.
- Vorläufiger Bericht über Versuche im grossen mit absolut reiner Oberhefe, nach Hansens Methode dargestellt. — Allg. Zeitschr. für Bierbr. und Malzfabr. Nr., 36. Vienne 1885.

- JOERGENSEN, Alfred. — Reingezüchtete Oberhefe. — Allgem. Brauer und Hopfentz. N. 8. Nuremberg, 1886.
- Ueber den Unterschied zwischen Pasteurs und Hansens Standpunkt in der Hefenfrage. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich, 1888.
- Neue Bemerkungen über die Kulturmethoden und die Analyse der Hefen. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich, 1888.
- Brefelds neue Hefenuntersuchungen. — Allg. Brauer- und Hopfentz. Nr. 74. Nuremberg, 1888.
- Die Behandlung der Hefe mit der Centrifuge. Allg. Brauer- und Hopfentz. Nuremberg 1888.
- Die zymotechnische Wasser-Analyse in Hueppes Buch: Die Methoden der Bakterienforschung. — 4. Aufl. 1889. — Centralblatt. für Bakteriologie. V. Bd., Nr. 22. 1889.
- The Micro-organisms of Fermentation practically considered. Londres 1889.
- Recension von: Duclaux. Sur la conservation des levures. Botanisches Centralblatt. X. Jahrg. 1889.
- Die Anwendung der nach Hansens Methode reingezüchteten obergärigen Hefe in der Praxis. — Brauer- und Mälzer-Kalender für Deutschland und Oesterreich. 1889-90.
- Die Aufbewahrung der ausgewählten Hefenrasse. — Allg. Zeitschr. f. Bierbr. und Malzf., Nr. 46. Vienne, 1890
- Sarcina. — Allg. Br. und Hopfentz'g. Nr. 115. Nuremberg, 1890.
- Zur Analyse der obergärigen Hefe in Brauereien und Brennerien nach Hansens Methode. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 3. Munich, 1891.
- Ueber die Analyse der Brauerihefe nach Hansens Methode. Der amerik. Bierbr. Chicago, 1891.
- Les méthodes de Pasteur et de Hansen pour obtenir des cultures pures de levure. — Une réponse à M. Vel-

- ten. — La Gazette du brasseur. Nr. 215. Bruxelles. 1891. (En allemand dans Allg. Brauer und Hopfenzeitung. Nuremberg 1891).
- JÖRGENSEN, Alfred. — Die Feinde des Brauereibetriebes. Vortrag, gehalten bei der schwedischen Brauerversammlung in Gothenburg Allgem. Brauer-und Hopfenzeitung. Nuremberg 1891.
- On the application of Hansens system in breweries with top-fermentation. Written for the International Brewers' Congress in Chicago. 1893. Dans Proceedings of the I. B. C. New-York. 1893. En allemand dans Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XVI. 1893
- Micro-organisms and fermentation. New Edition. Londres 1893.
- Les microorganismes de la fermentation. Paris 1894.
- On Hansens system of Pure Yeast Culture in english top-fermentations. With some expérimental inquiries and critical remarks on Dr. van Laers composite yeast. Trans. Inst. of Brewing. VII. London 1894. Rapport par Holzner: Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XVII. 1894.
- Hansens Hefereinzucht-System in der englischen Obergärung. Experimentelle Untersuchungen und Bemerkungen betreffend die zusammengesetzte Hefe des Herrn Dr. van Laer. Allg. Brauer- und Hopfenzeit. Nuremberg 1894.
- A correction of certain assertions on Jörgensens analyses of van Laer's composite yeast. The Brewers journal. Febr. Londres 1895.
- Der Ursprung der Weinhefen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
- Ueber den Ursprung der Alkoholhefen. Berichte des Garungsphysiolog. Laboratoriums von Alfred Jörgensen. I. Copenhague 1895.
- Ueber Pilze, welche Uebergangsformen zwischen Schim-

- mel- und Saccharomyceshefe bilden, und die in der Brauereiwärze auftreten. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. II. 1896.
- JÖRGENSEN Alfred et HOLM, JUST. CHRIST., Le procédé de M. Efront pour la purification et la conservation de la levure à l'aide de l'acide fluorhydrique et des fluorures. *Moniteur scientif. du D^r. Quesneville.* 4 sér. VII Mars. Paris 1893. (*Chemiker-Zeit.* Nr. 23, 1893. *Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen* 1893).
- Antwort auf Efronts Bemerkungen rücksichtlich unserer Untersuchungen über die Einwirkung der Flusssäure auf die verschiedenen in der Garungsindustrie auftretenden Mikroorganismen. *Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen.* XVI. 1893. *Z. f. Spiritusindustrie* 1893.
 - Untersuchungen über des Ausarten des Brauereihefe. *Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen.* Munich. 1898.
- JUHLER. — Ueber die Umbildung des *Aspergillus Oryzae* in einen Saccharomyceten. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. I. 1895.
- KABRHEL, G., — Ueber das Ferment der Milchsäuregärung in der Milch. *Allgem. Wien. med. Ztg.* 1889.
- Zur Frage der Stellung des Kaseins bei der Milchsäuregärung. *Zeitschr. f. Hygiene.* 1895.
- KAYSER E. — Action de la chaleur sur les levures. *Ann. de l'Inst. Pasteur.* III. 1889.
- Etudes sur la fermentation du cidre. *Ann. de l'Inst. Pasteur.* IV. 1890.
 - Note sur les ferments de l'ananas. *Ann. de l'Inst. Pasteur.* V. 1891.
 - Contribution à l'étude physiologique des levures alcooliques du lactose. *Ann. de l'Inst. Pasteur.* V. 1891.
 - Contribution à l'étude des levures de vin. *Ann. Inst. Pasteur.* VI. 1892.

- KAYSER, E. — Levures sélectionnées en vinification. Rapports Bulletin du ministère de l'agriculture. Paris. 1892-1896.
- Contribution à l'étude de la fermentation lactique. Thèse pour obtenir le grade de Dr. ès- sc. Sceaux. 1894. Ann. Inst. Pasteur. VIII. 1894.
 - Vitalité des levures. La Bière et les boissons fermentées. 1895.
 - Levures de vin. Ann. Inst. Pasteur. X. 1896.
 - Contribution à l'étude des levures de vin. Revue de viticulture. Paris. 1896.
 - Levures de bananes. La Bière et les boissons fermentées. 1896.
 - Fabrication de vin d'orge. Ann. Inst. Pasteur. X. 1896.
 - Les levures. Paris. 1896.
- KEDROWSKI, W. — Ueber zwei Buttersäure hervorbringende Bakterienarten. Zeitschr. f. Hygiene. XVI.
- KELNER, MORI UND NAGAOKA. — Beiträge zur Kenntnis der invertierenden Fermente. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. XIV. 1889.
- Researches on the manufacture, composition and properties of Koji. Imperial University-College of Agriculture. Vol. I. Tokyo.
- KELLNER, O. — Ueber die Bereitung von Sake, Shoyu und Miso. Chemiker-Zeitung. XIV. 1895.
- KERN. — Ueber ein Milchferment des Kaukasus. Bull. de la soc. impériale des naturalistes de Moscou. 1891. Botanische Ztg. 1882. Biolog. Centralblatt 1882.
- KIRCHNER, M. — Gesichtspunkt für die Beurteilung und Prüfung von Wasserfiltern. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIV. 1893.
- KLEBS. J. — Ueber fraktionierte Kultur. Archiv. f. experiment. Pathologie. Bd. I.

- KLECKI, V. v. — Untersuchungen über das Ranzigwerden und die Säurezahl der Butter. Leipzig 1894.
- Ueber einige aus ranziger Butter kultivierte Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XV. 1894.
 - Ein neuer Buttersäuregärungserreger (*Bacillus saccharobutyricus*) und dessen Beziehung zur Reifung und Lochung des Quargelkäses. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
 - Ueber den Reifungsprozess der Käse. Centr. f. Bakt. u. Parasit. 2. Abt. II. 1896.
- KLEIN, C. — Beitrag zur Kenntniss des roten Malzschimmels. Mitt. d. österr. Vers. Stat. f. Brauerei. V. Heft. Vienne. 1892.
- E. — Micro-organisms and disease. Londres.
 - L. — Botan. Bakterienstudien I. Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde. VI. 1889.
 - Botan. Bakterienstudien II. Berichte der Deutschen Botan. Gesellschaft. VII. Berlin 1889.
- KLOCKER und SCHIONNING. — Experimentelle Untersuchungen über die vermeintliche Umbildung des *Aspergillus Oryzæ* in einen *Saccharomyces*. Centralbl. f. Bakt. u. Parasit. 2. Abt. I. 1895
- KLÖCKER, A. — Recherches sur les *Sacch. Marxianus*, *S. apiculatus* et *S. anomalus*. Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Lab. IV. B. 1. H. 1895.
- KLÖCKER, A. ET SCHIONNING, H. — Que savons nous de l'origine des *Saccharomyces*? Compt. rend. d. Meddelels. fra Carlsb. Lab. IV. B. 2. H. 1896.
- Experimentelle Untersuchungen über die vermeintliche Umbildung verschiedener Schimmelpilze in *Saccharomyceten*. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- KNIERIM, W. v. und AD. MAYER. — Ueber die Ursache der Essiggärung. Die landw. Versuchsstat. XVI. 1873.

- Koch, Alfred. — Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen. I—V. 1891-1896.
- und HORAEUS, H. — Ueber einen neuen Froschlauch der Zuckerfabriken. Centr. f. Bakt. u. Paras. XVI. 1894.
- Das Verhalten der Hefen gegen Glykogen. Centr. f. Bakt. u. Paras. XIV. 1894.
- K. H. — Ergebnis der Kostprobe mit und ohne Reihefe vergorener Rhein Hessischer Weine. Weinbau. u. Weinh. XIV. Mayence 1896.
- R., — Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien. Beitr. z. Biol. II.
- Über Desinfektion. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. 1881.
- Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. I. Berlin 1881.
- KOEHLER, J. — *Saccharomyces membranæfaciens* Hansen. Mitt. d. österr. Versuchsstat. f. Brauerei. V. Heft. Vienne 1892.
- KOKOSINSKY, Ed. — *Levure pure de fermentation haute*. Gaz. du brasseur. 1889.
- A propos de levures pures. La brasserie du Nord (de la France). 1889.
- La levure pure. Gaz. du brass. 1890.
- Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute dans le Nord de la France. Compt. rend. de la Station scientifique de brasserie. Gand I. 1890.
- KORSCHULT, O. — Ueber Sake, das alkoholische Getränk der Japaner. Dinglers Polyt. Journ. 230. 1878.
- KOSAI, J. und YABE, K. — Ueber die bei der Sakebereitung beteiligten-Pilze. Vorläufige Notiz. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. I. 1895.
- KOSUTANY. — Ueber den Einfluss der verschiedenen Weinhefen auf den Charakter des Weines. Landw. Versuchsstationen. XL. 1892.

- KRAMER, ERNEST. — Studien über die schleimige Gärung. Sitzb. d. K. Akad. d. Wiss. Wien. Monatshefte für Chemie. X. 1889.
- Einwirkung von *Saccharomyces Mycoderma* auf Wein. Agramer botan.-phys. Inst. 1889.
 - Bakteriologische Untersuchungen über das « Umschlagen » des Weines. Landwirtschaftl. Versuchsstationen. XXXVII.
 - Ueber einen rotgefärbten, bei der Vergärung des Mostes mitwirkenden Sprosspilz. Osterr. landw. Centralbl. I. 1891.
- KRANNHALS, H. — Ueber das kumysähnliche Getränk « Kefir » und über den Kefirpilz. Deutsch. Archiv. f. Klin. Medizin. XXXV. 1884.
- KRASSER. — Ueber das angebliche Vorkommen eines Zellkerns in den Hefenzellen. Oesterr. botan. Zeitschr. 1883.
- Ueber den Zellkern der Hefe. Osterr. Bot. Zeitschr. 1893.
- KRATSCHEMER und NIEMIŁOWICZ. — Ueber eine eigentümliche Brotkrankheit. Wiener klin. Woch. 1889.
- KREUTZER, J. — Die Vermehrung der Reinhefe in der Praxis. Ber. d. Versuchsstat. f. Brauindustrie in Böhmen. Heft. VII. Prag 1896.
- KRUIS, K. und RAYMAN, B. — Chemisch-biologische Studien. II. Bull. internat. Acad. scienc. de l'emp. François-Joseph. Cl. sienc. math. natur. Prague 1895. (Voir Rayman).
- KUKLA. — Die heurigen trüben Biere. Bericht der Versuchsanstalt für Brauindustrie in Böhmen. Prager Brauer- und Hopfenztg. Prague 1889.
- KÜTZING. — Mikrosk. Untersuch. über die Hefe und Essigmutter. Journal für prakt. Chemie. II. 1837.
- *Phycologia generalis*. 1843.
 - Grundzüge der philosophischen Botanik. 1851.

LAER, H. VAN. — Note sur les fermentations visqueuses. Mémoires couronnés et autres mémoires publ. par l'Académie royale de Belgique XLIII. 1889.

— Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute. Station scientifique de brasserie. Compt. rend. I. Gand 1890.

— Contributions à l'histoire des ferments des hydrates de carbone. Bacille des bières tournées. Mém. publ. par l'Acad. royale de Belgique. 1892.

— Studies on secondary fermentation and frets. Trans. Inst. of Brewing. VII. Londres 1894.

— Remarks on Jorgensens experiments. Brewing Trade Rev. Londres 1894.

— Recherches sur la composition d'une levure mixte de fermentation haute. Bull. assoc. Belge des chimistes. IX. 1895.

LAER ET DENAMUR. — Notice sur une levure à atténuation — limite très élevée. Moniteur scientifique. 1895.

— ET V. D. HULLE. — Nouvelles recherches sur les bières Bruxelloises a fermentation dite spontanée. Mém. cour. et autres mém. publiés par l'Acad. Royale de Belgique. 1891.

LAFAR, F. — Bakteriologische Studien über Butter. Archiv. f. Hygiene. XIII. 1891.

— Physiologische Studien über Essiggärung und Schnell-essigfabrikation. I. Ueber einen Sprosspilz, welcher kräftig Essigsäure bildet. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenk. XIII. 1893. II. Die Säuerungskraft von Bacterium aceti Hansen und B. Pasteurianum H. in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur. Ibid. 2. Abt. I. 1895.

— Biologische Studien über das Enzingerfilter. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich. 1894.

— Die künstliche Säuerung des Hefengutes in Brennereien. Centralbl. für Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.

- LAFAR, E.— Studien über den Einfluss organischer Säuren auf Eintritt und Verlauf der Alkoholgärung. I. Die Weihenfen und die Essig-säure. Landw. Jahrb., herausg. v. Thiel. 1897.
- Technische Mykologie. I. Mit einem Vorwort von Emil Chr. Hansen. Iéna 1897.
- LANG ET FREUDENREICH. — Ueber *Oidium lactis*. Landw. Jahrb. v. Thiel. VII. 1893.
- Sur l'*Oidium lactis*. Ann. de micrographie. Fevrier. Paris. 1894.
- LANGER, TH. — Grundris der Chemie für Brauer- und Mälzer. Leipzig 1890.
- LASCHÉ, A. — Die amerikanische Brauhefe. Der Braumeister. Chicago 1891.
- *Mycoderma*-Arten. Der Braumeister. Chicago 1891.
- Das *Mycoderma* und die Praxis. Der Braumeister. Chicago 1891.
- *Saccharomyces Joergensenii*. Der Braumeister. Chicago 1892.
- Zwei rotgefärbte *Mycoderma*-Arten. Der Braumeister. Chicago 1892.
- Ueber das Verhalten gewisser Reinhefearten in der Praxis. Der Braumeister. Chicago 1892.
- Einfluss verschiedener Wärmegrade auf gewisse Hefenarten sowie deren Verhalten in säurehaltigen und alkalischen Nährsubstanzen. Der Braumeister. Chicago 1892.
- Die Bestimmung der Zuckerarten durch Vergärung. Vortrag vor d. Internat. Brauer-Kongress in Chicago 1893. American. Brewers' Review. Chicago 1893.
- LAURENT, C. — Le Bactérie de la fermentation panaiere. Bull. de l'Acad. roy. de Belgique. X. 1885.
- LAURENT, E. — Recherches sur le polymorphisme du *Cladosporium herbarum*. Ann. Inst. Pasteur. II. 1888.

- LAURENT, E. — Note sur les formes-levures chromogènes. Bull. de la soc. roy. de botan. de Belgique. XXIX. 2.
- Nutrition hydrocarbonée et formation de glycogène chez la levure de bière. Ann. Inst. Pasteur. III. 1889.
- LECHARTIER ET BELLAMY. — Étude sur les gaz produits par les fruits. — Note sur la fermentation des fruits. Compt. rend. ac. sc. LIX, 1869; LXXV, 1872; LXXIX, 1874.
- LEHMANN, K. B. — Ueber die Sauerteiggärung und die Beziehungen des Bacillus levans zum Bacillus coli communis. Centr. f. Bakt u. Par. XV. 1894.
- LEICHMANN, G. — Ueber die freiwillige Säuerung der Milch. Milchzeitung. XXIII. Kiel 1894.
- Ueber eine schleimige Gärung der Milch. Landw. Vers. Stat. XLIII.
- Die Benennung der Milchsäurebacillen. Zeitschr. f. Spiritusind. XIX. 1896.
- Ueber die im Brennereiprozess bei der Bereitung der Kunsthefe auftretende spontane Milchsäuregärung. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- Ueber die freiwillige Säuerung der Milch. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- LIBORIUS, P. — Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. Z. f. Hygiene. I. Berlin 1886.
- LIESENBERG, C. und ZOPF, W. — Ueber den sogen. Froschlaichpilz (Leuconostoc) der europ. Rübenzucker- und der javanischen Rohrzuckerfabriken. Beitr. z. Phys. u. Morph. niederer Organismen, herausg. v. Zopf. Heft 1 u. 2. Leipzig 1892.
- LINET, L. — Influence de la température de fermentation sur la production des alcools supérieurs. Compt. rend. ac. sc. Paris. CVII. 1888.
- LINDNER, P. — Ueber ein neues, in Malzmaischen vorkommendes, Milchsäure bildendes Ferment. Wochenschr. f. Br. 1887.

- LINDNER, P. — Die Askosporen und ihre Beziehungen zur Konstanz der Hefenrassen. Wochenschr. f. Br. 1887.
- Ueber rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. Wochenschr. f. Br. Berlin 1887.
 - Nachweis von Mikroorganismen in der Luft von Gärungsbetrieben Wochenschr. f. Br. 1887.
 - Verändert sich der Charakter einer Brauereihefe bei fortgesetzter Kultur unter veränderten Ernährungsbedingungen? Wochenschr. f. Br. 1888.
 - Ueber einige Gärversuche mit verschiedenen Hefen. Wochenschr. f. Br. 1888.
 - Das Langwerden der Würze durch *Dematium pullulans*. Wochenschrift f. Br. 1888.
 - Die *Sarcina*-Organismen der Gärungsgewerbe. Berlin 1888.
 - Ruft *Sarcina* im untergärigen Biere Krankheitserscheinungen hervor oder nicht? Wochenschr. f. Br. 1890.
 - Bemerkungen zu Jörgensens Aufsatz über *Sarcina*. Wochenschr. f. Br. 1890.
 - Welche sind die besten Heferassen zur Vergärung von Dickmaischen und für die Presshefefabrikation. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. Ergänzungsheft. 1890.
 - Ueber die Erkennung der Heferassen und ihre photographische Darstellung. Wochenschr. f. Br. 1891.
 - Die Einzelkultur im hängenden Tropfen. Gealterte Zellen in frischer Würze. Abnormale Zellformen und Querwandbildungen bei Betriebshefen. Wochenschr. f. Br. 1893.
 - Das Wachstum der Hefen auf festen Nährböden. Wochenschr. f. Br. 1893.
 - *Saccharomyces farinosus* und *Bailii*. Wochenschr. f. Br. 1893.
 - *Schizosaccharomyces Pombe* n. sp., ein neuer Gärungserreger. Wochenschr. f. Br. 1893.

- LINDER, P.—Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsge-
werben Berlin 1895.
- Die Vegetationsverhältnisse im untergärigen Bier während der Nachgärung. Wochenschr. f. Br. 1895.
 - Die Weinsäurekur für sarcinahaltige Zeuge. Wochenschr. f. Br. 1895.
 - Fruchtfätherbildung durch Hefen in Grünmalz und in Würzen. Wochenschr. f. Br. 1896.
 - Die Reinhefe in der Presshefefabrikation und in der Kornbrennerei. Brennerei-Zeitung. XII. 1896.
 - Beobachtungen über die Sporen- und Glykogenbildung einiger Hefen auf Würzegeatine. Die Blaufärbung der Sporen von Schizosaccharomyces octosporus durch Jodlösung. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- LING, A. — Journal of The Federated Institutes of Breewing. Londres 1895 fig.
- LING, A. und Baker J. — Action of Diastase on Starch. I, II. Trans. chem. Soc. 1895.
 - LIHOSSIER, G. et ROUX, G. — Sur la fermentation alcoolique et la transformation de l'alcool en aldehyde provoquées par le champignon du muguet. Compt. rend. ac. sc. Paris. CX. 1890.
 - Sur la fermentation alcoolique et la transformation de l'alcool en aldehyde provoquées par le champignon du muguet (*Oidium albicans*). Ann. de micrographie. III. 1890/91.
- LINOSSIER, G. — Action de l'acide sulfureux sur quelques Champignons inférieurs et en particulier sur les levures alcooliques. Ann. Inst. Past. V. 1891.
- Sur le dédoublement de l'acide lactique inactif par les moisissures. Bull. soc. chem. Paris. [3.] V.
- LINTNER, C. — Ueber Biertrübung. Der Bayrische Bierbrauer. 1871.

- LINTNER, C. J. — Ueber einige Resultate zymotechnischer Untersuchungen. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. 1876.
- Lehrbuch der Bierbrauerei. 1878.
 - Ueber Malz und dessen Einfluss auf die Haltbarkeit und Güte des Bieres. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. 1880.
 - Altes und Neues über Bierbrauerei. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. 1881.
 - Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1884. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1885.
 - Ueber Isomaltose und deren Bedeutung für die Bierbrauerei. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1892
 - Ueber die Vergärbarkeit der Isomaltose. Ibid. 1892.
 - Ueber einige die Beschaffenheit des zu erzielenden Bieres beeinflussende Vorgänge bei der Malzbereitung und beim Maischen. Vortrag geh. a. d. 7. deutsch. Brauertag. Hamburg. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1892.
 - Ueber den Einfluss der Stärkeumwandlungsprodukte gegenüber der Diastase bei höheren Temperaturen. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1892.
- LINTNER, C. J. und G. DÜLL. — Ueber den Abbau der Stärke unter dem Einflusse der Diastasewirkung. Ber. d. deutsch. Chem. Gesellsch. XXVI. 2533. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XVI. 1893.
- LINTNER, C. J. — Grundriss der Bierbrauerei. Berlin 1893.
- Handbuch der landwirtschaftlichen Gewerbe. Berlin 1893.
 - Ueber die Invertierung von Maltose und Isomaltose durch Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XVII. Munich 1894.
- LINTNER, C. J. und KRÖBER, E. — Zur Kenntnis der Hefeglykase. Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft. XXVIII. 1895.

- LISTER. — On the nature of fermentation. Quarterly journal of microscopical science. Vol. 13. 1873. Vol. 18. 1878.
- On the lactic fermentation and its bearing on pathology. Transact. of the Pathological Society of London. Vol. 29. 1878.
- LOEFFLER. — Vorlesungen über die geschichtliche Entwicklung der Lehre von den Bakterien. 1887.
- LOEW, E. — Ueber *Dematium pullulans*. Pringsh. Jahrb. Bd. IV.
- LOEW, O. — Die chemischen Verhältnisse des Bakterienlebens. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde. IX. 1891.
- LOHMANN, W. — Ueber den Einfluss des intensiven Lichts auf die Zellteilung bei *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Hefen. Inaug. Diss. Rostock 1896.
- LUDWIG, F. — Weitere Mitteilungen über Alkoholgärung und die Schleimflüsse lebender Baume. Centr. f. Bakt. und Paras. VI. 1889.
- Notiz über die Verbreiter der Alkoholgärung und des Schleimflusses der Eichen und verw. Baumkrankheiten: Deutsche hotan. Monatschr. VIII. 1890.
- MAC-CARTIE, J. C. — Zur Reinzucht obergäriger Hefe. Allg. Brauer- und Hopfenzeitung. Nuremberg 1889. Rapport dans Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Munich 1889. Pure yeast: Brewers' Journal, Londres No. 291. 1889.
- MACÉ, E. — Traité pratique de bactériologie. Paris 1892.
- MACH, E. und PORTELE, K. — 1. Ueber die Gärung von Trauben- und Aepfelmösten mit verschiedenen reingezüchteten Hefenarten. 2. Ueber das Verhältnis, in welchem sich Alkohol und Hefe während der Gärung bilden. 3. Ueber den Gehalt an stickstoffhaltigen Substanzen in Traubenmosten aus dem Anstaltsgute in S. Michele. 4. Ueber die Veränderungen im Gehalt von Gesamtsäure und Glycerin während der Gärung und Lagerung der Weine. 5. Versuch über

- die Abnahme des Farbstoffgehaltes beim Lagern der Weine. 6. Ueber die Zusammensetzung einer Anzahl Aepfel- und Birnensorten aus dem Anstaltsgute. Die landwirtsch. Versuchsstationen XLI. Berlin 1892.
- MAERCKER, M. — Handbuch der Spiritusfabrikation. 6. Auflage. Berlin 1894.
- CLUSS und SCHUPPAN. — Das Flusssäureverfahren in der Spiritusfabrikation. Berlin 1891.
- MAFFUCCI e SIRLEO. — Osservazioni e esperimenti intorno ad un blastomicete patogeno. Il Policlinico. 1895.
- MANN, H. H. — Action de certaines substances antiseptiques sur la levure. Ann. Inst. Pasteur. VIII. 1894.
- MARCANO. — Fermentation de la fécule, présence d'un vibrion dans les grains du maïs qui germe. Compt. rend. ac. sc. Paris 1882.
- MARCHAL, E. — Contribution à l'étude microbiologique de la maturation des fromages mous. Ann. de la soc. belge de microscopie. XIX. 1895.
- MARESCALCHI, O. — L'aceto. Biblioteca agraria Ottavi. IV. Casale 1896.
- MARPMANN, G. — Bakterienbefunde im Leipziger Fluss- und Teichwasser und im Roheis. Ber. der Pharmac. Gesellschaft. III. 1893.
- Ueber blaue Hefen. Zeitschr. f. angewandte Mikroskopie. II. 1896.
- MARSHALL-WARD, H. — The Ginger-Beer plant, and the organisms composing it. Philos. trans. Roy. soc. Vol. 183. B. 1892.
- The action of light on bacteria. Proceed. Roy. soc. LIV. Londres 1893.
- On the biology of Bacillus ramosus (Fraenkel), a Schizomycete of the River Thames. Fourth report to the Roy. Soc. Water Research Committee. 1895.
- MARTIN. — Épuration ou stérilisation des eaux de rivière destinées à la boisson. Ann. de Microgr. VII 1896.

- MARTINAND. — Étude sur l'analyse des levûres de brasserie. Compt. rend. ac. sc. Paris. CVII. 1888.
- ET RIETSCH. — Des micro-organismes que l'on rencontre sur les raisins mûrs et de leur développement pendant la fermentation. Compt. rend. ac. d. sc. Paris. CXII.
- MARX, L. — La levûre pure de brasserie. Revue universelle de la brasserie et la malterie. 1885.
- Les levûres des vins. Moniteur scientifique du D^r. Quesneville. Paris 1888.
- Le laboratoire du brasseur. 2^{me} éd. Paris 1889.
- MATTHEWS. — On the red mould of barley. Journal of the Royal Micr. Soc. Londres 1883.
- MEISSL, E. — Die Prüfung der Hefe auf die Gärkraft. Zeitschr. f. d. g. Brauw. Munich 1884.
- MELTZER, S. J. — Ueber die fundamentale Bedeutung der Erschütterung für die lebende Materie. Zeitschr. f. Biologie. XXX. 1894.
- MIFLET. — Untersuchungen über die in der Luft suspendierten Bakterien. Beitr. z. Biol. der Pflanzen. III. 1879.
- MILLER, A. and HYDE, F. — The application of pure yeast (Hansens method) to high fermentation. Trans. North of Engl. Inst. of Techn. Brewing. III. 1894.
- MIQUEL. — Études sur les poussières organisées de l'atmosphère. Annuaire de l'observ. de Montsouris pour l'an 1879.
- Nouvelles Recherches sur les poussières organ. de l'atmosph. Ann. de l'obs. Montsouris. 1880.
- Étude générale sur les bactéries de l'atmosphère. Extrait de l'annuaire de Montsouris. 1881.
- Études générales des bactéries de l'atmosphère. Ann. de l'observ. Montsouris 1882.
- Des organismes vivants de l'atmosphère. Paris 1883.
- Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux. Ann. de Montsouris pour 1888.

- MIQUEL. — De l'analyse microscopique de l'air au moyen de filtres solubles. Ann. de micrographie. Paris 1889.
- Monographie d'un bacille vivant au-delà de 70° centigrades. Ann. de micrographie. I. Paris. 1888-89.
 - Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux. Paris 1891.
 - Du pouvoir stérilisant des filtres en biscuit. Ann. de micrographie. V. 1893.
 - Sur la possibilité de retarder considérablement la propagation des bactéries à travers les filtres en biscuit. Ann. de micrographie. V. 1893.
 - De la désinfection des poussières sèches des appartements. Ann. de microgr. VI 1894. VII. 1895.
 - Contribution nouvelle à l'étude de la désinfection par les vapeurs d'aldehyde formique. Ann. de micrographie VI. 1894.
 - ET LATTRAÏE. — De la résistance des spores des bactéries aux températures humides égales ou supérieures à 100°. Ann. de micrographie. VII. 1895.
- MITSCHERLICH. — Lehrbuch der Chemie. 1834.
- MIX, CH. L. — On a Kephir-like yeast found in the United States. *Proced. of the Americ. Acad. of Arts and Sciences.* XXVI. 1891.
- MOELLER, F. J. — Neuerungen im Verfahren zur Erzeugung von Kunsthefe. (Anwendung des elektrischen Stromes). *Oesterr.-Ungar. Zeitschr. f. Zuckerind. u. Landw.* 1894.
- Verfahren zur Bereitung von Hefe unter Anwendung des elektrischen Stromes. *Zeitschr. f. Spiritusind.* XVIII. 1895.
 - H. — Weitere Mitteilungen über den Zellkern und die Sporen der Hefe. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasit.* XIV. 1893.
 - Neue Untersuchungen über den Zellkern und die Sporen der Hefe. *Ber. d. d. botan. Gesellsch.* 1893.

- MOLISCH, H. — Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. Sitzungsber. d. K. Ak. d. Wiss. Wien. Math.-naturw. Kl. CIII. Abt. 1. 1894.
- MORRIS G. H. and WELLS. — Fractional fermentation. A contribution to the study of the Amyloines (Maltodextrines). Trans. Institute of Brewing. May. Londres 1892.
- MÜLLER-ALZEY. — Ergebnisse der vom Landw. Verein veranlassten Versuche über Anwendung von Reinhefe in Rheinhessen. Weinbau u. Weinh. No. 7. Mayence 1896.
- THURGAU, H. — Der Milchsäurestich in Trauben- und Obstweinen. Jahresber. d. Schweiz. Versuchsstat. Wädensweil 1892-93.
- Gewinnung und Vermehrung von Weinheferassen, Ansiedelung guter Weinhefen im Weinbergsboden, Eigenschaften und Verwendung der Reinhefen. IV. Jahresber. der deutsch-schweiz. Versuchsstation Wädensweil 1893-94. Weinbau u. Weinh. 1894.
- Konservierung von unvergorenem Trauben- und Obstsaft. Jahresber. d. schweiz. Versuchsstation Wädensweil. IV. 1893-94.
- Weitere Untersuchungen über die Physiologie der Hefe und die Bedeutung ausgewählter und reingezüchteter Heferassen für die Weingärung III. Jahresber. d. Versuchsstation Wädensweil. 1892-93. Zurich 1894.
- Ueber neuere Erfahrungen bei der Anwendung von Reinhefen in der Weinbereitung. Weinbau u. Weinh. Mayence 1896.
- Neuere Erfahrungen bei Anwendung der Reinhefen in der Weinbereitung. Vortrag, geh. b. d. XIV. Deutschen Weinbau-Kongress Neustadt. Mayence 1896.
- Ueber Säureabnahme im Wein. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abth. II. 1896.

- MULLER-THURGAU, H. — Die Herstellung unvergorener und alkoholfreier Obst- u. Traubenweine. Frauenfeld 1896.
- Erfahrungen bei Züchtung von Heferassen für bestimmte Zwecke. Weinbau u. Weinh. 1897.
- MUNSCHÉ, A. — Beiträge zur experimentellen Prüfung der Gesetze der natürlichen Reinzucht. I. Wochenschr. f. Brau. XII. 1895; Fortsetzung: Zeitschr. f. Spiritusindustrie. XVIII. 1895.
- NEGELI, — Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektions-Krankheiten. Munich 1877.
- und LÖEW. — Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. Sitzb. der bayer. Akad. d. Wissensch. 1878.
- Theorie der Gärung. 1879.
- Ueber die Bewegungen kleinster Körperchen. Sitzb. d. math.-phys. Klasse d. Akad. d. Wissensch. Munich 1879.
- Untersuchungen über niedere Pilze. Munich 1882.
- NASTUKOFF, A. — Essais sur le pouvoir réducteur des levures pures, moyens de les mesurer. Ann. Inst. Pasteur. IX. 1895.
- NATHAN. — Die Bedeutung der Hefenreinzucht für die Obstweinbereitung. Der Obstbau. Stuttgart 1891. Wittmacks Gartenflora. Berlin 1891.
- Neuere Fortschritte auf dem Gebiete der Fruchtweinbereitung. Der Obstbau. Stuttgart 1892.
- Fortschritte auf dem Gebiete der Fruchtweinbereitung. Vortrag auf dem deutschen Pomologenkongress in Breslau, 28. Sept. 1893. Stuttgart 1893.
- NENCKI, M. — Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einiger Spaltpilzarten. Centralbl. f. Bakt. und Parasitenkunde. IX. 1891.
- NEZLER, J. — Das Krankwerden der Weine. Vortrag. Weinbau u. Weinhandel. Mayence 1895.

- NEZLER, J. — Die Ursachen des Krankwerdens der Weine. Ber. d. XIV. deutschen Weinbau-Kongresses in Neustadt. Mayence 1896.
- Ueber das Schwarz-, Grau-, Blau- oder Grünwerden der Obst- und Traubenweine. Weinbau u. Weinh. XIV. 1896.
- NEUMAYER, JOH. — Untersuchungen über die Wirkung der verschiedenen Hefearten, welche bei der Bereitung weingeistiger Getränke vorkommen, auf den menschlichen und tierischen Organismus. Inaug.-Diss. Munich 1890.
- NIESEN, J. CHR. — Sur le développement des spores du Sacch. membranæfaciens, du Sacch. Ludwigii et de Sacch. anomalus. Compt. rend. d. Meddelels. fra Carlsberg Lab. III v. 3 1894.
- NORDMEYER, H. — Ueber Wasserfiltration durch Filter aus gebrannter Infusorienerde. Zeitschr. f. Hygiene. X. 1891.
- OLSEN, JOHAN. — Er Sublimat i en Fortyding af 1 pro Mille et paalideligt Desinfektionsmiddel? Nyt Magasin for Læger XIV. B. Christiania 1884.
- Gjæring og Gjæringsorganismer. Christiania 1890.
- Zur Pleomorphismusfrage. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. III. 1897.
- OMELIANSKI. — Sur la fermentation de la cellulose. Compt. rend. ac. sc. CXXI. 1895.
- OMORI, J. — Researches on the origin of Japanese Saké-Yeast. Contribution from the Botan. Laborat. of the College of Agriculture of the Imperial University of Tokio. Bot. Magazine, Tôkjô, X, Nr. 118. 1896. (Résumé).
- PAMMEL, L. H. — An aromatic bacillus of cheese, Bac. aromaticus n. sp.
- some bacteriological work in the dairy.
- PASTEUR, L. — Mémoire sur la fermentation appelée lactique. Ann. de chim. et de phys. LII. 1838.

- PASTEUR, L. — Mémoire sur la fermentation alcoolique. Ann. de chim. et de phys. LVIII. 1860.
- Fermentation butyrique. Animalcules infusoires vivant sans oxygène libre et déterminant des fermentations. Compt. rend. ac. sc. LII. 1861.
 - Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Ann. de chim. et de phys. 3. sér. LXIV. 1862.
 - Mémoire sur la fermentation acétique. Ann. scientif. de l'École normale supérieure. I. 1864.
 - Études sur le vin. 1866. 2^{me} édition 1872.
 - Études sur le vinaigre. 1868.
 - Études sur la bière. 1876.
 - Note sur la fermentation des fruits et sur la diffusion des germes des levûres alcooliques. Compt. rend. ac. sc. LXXXIII. 1876.
 - Examen critique d'un écrit posthume de Claude Bernard sur la fermentation alcoolique. Lecture faite à l'académie de Médecine le 26 nov. 1878.
- PEDERSEN, R. — Recherches sur quelques facteurs qui ont de l'influence sur la propagation de la levûre basse du Sacch. cerevisiæ. Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. I. Volume 1. livr. 1878.
- Sur l'influence que l'introduction de l'air atmosphérique dans le moût qui fermente exerce sur la fermentation. Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. I. Vol. 1. Livr. 1878.
- PETERS, R. — Das Lab und die Labähnlichen Fermente. Preisschrift von der med. Fac. Rostock gekrönt.
- PETERSEN, A. — Einige Bemerkungen über das Lüften der Würze. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1888.
- Sarcina im Biere ohne irgend eine Krankheiterscheinung. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1890.

- PETRI. — Zusammenfassender Bericht über Nachweis und Bestimmung der pflanzlichen Mikroorganismen in der Luft. *Centralbl. für Bakt. und Parasitenk.* II. Bd. 1887.
- PFUND P. — Theorie und Praxis der Schnellseigfabrikation. *Dinglers Polyt. Journal*, Bd. 211. 1874.
- PICHI, P. — Sopra l'azione dei soli di rame nel mosto di uva sul saccharom. ellipsoideus. Nuova rassegna di viticoltura ed enologio. Fase. n. 5. 1891.
- Ricerche morfologiche e fisiologiche sopra due nuove specie di *Saccharomyces* prossime al *S. membranaefaciens* di Hansen. 1^o mem. con 4 tav. Estratto degli *Annali della R. Scuola di viticoltura e di Enologia in Conegliano*. Ser. III. Anno I. Fasc. 2. 1892.
 - Sulla fermentazione del mosto di uva con fermenti selezionati. *Ibid.* Ser. III, Ann. 1. Fasc. 1. 1892.
 - E MARESCALCHI. — Sulla ferment. del mosto di uva con fermenti selezionati. Nota 2^{ma}. *Ibid.* Ser. III, An. 1. Fasc. 3. 1892.
 - Ricerche fisiopatologiche sulla vite in relazione al parassitismo della peronospora. *Ibid.* Ser. III, An. 1. Fasc. 1. 1892.
- PIROTTA ET RIB. — *Studii sul latte.* (*Saccharomyces galacticola*). Pavia. 1879.
- POPOFF. — Sur un bacille anaérobie de la fermentation painaire. *Ann. Inst. Pasteur.* IV. 1890.
- POTTEVIN, H. — Recherches sur le pouvoir antiseptique de l'aldéhyde formique. *Ann. Inst. Pasteur.* VIII. 1894.
- PRAZMOWSKI. — Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten (*Clostridium butyricum*). Leipzig 1880.
- PRINSEN-GEERLIGS. — Eine technisch angewandte Zuckerbildung aus Reis durch Pilze. *Chemiker-Ztg.* XIX.

- PRIOR, E. — Ueber die Erfahrungen beim Arbeiten mit Nürnberger Reinhefen. Bayr. Brauer-Journal. Nuremberg 1891.
- Ueber die Umstände, welche den Vergärungsgrad des Bieres bei der Haupt- und Nachgärung bedingen. Bayr. Brau.-Journ. IV. 1894.
 - Sind die Hefen Froberg und Saaz d. Berl. Br. Stat. Hefetypen im physiolog. Sinne. Bayr. Brau.-Journal. (Tirage à part).
 - Ueber die Menge und Natur der bei der Vergärung von Bierwürzen vermittelt verschiedener Heferassen gebildeten Säuren. Bayr. Brauer-Jour. V. 1895.
 - Physikalisch-chemische Erklärung der Gärungerscheinungen. Bayr. Brauer-Journal. V. 1895.
 - Reinhaltung und Reinigung von Betriebshefen. Bayr. Brauer-Journal. V. 1895.
 - Ueber die Erklärung der Gärungerscheinungen. Bayr. Brauer-Journal. Nuremberg 1895. Forschungsberichte über Lebensmittel. Munich 1895.
 - Die Beziehungen des osmotischen Druckes zu dem Leben der Hefe und den Gärungerscheinungen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
 - Ueber ein drittes Achroodextrin und die Isomaltose. Ibid. 2. Abt. II. 1896.
 - Ueber den Nachweis des Zuckers in vergorenem Würzen und den unvergärbaren Würzerest der Hefen Saaz, Froberg und Logos. Ibid. 1896.
 - Die Beziehungen des osmotischen Druckes zu dem Leben der Hefe und den Gärungerscheinungen. Bayr. Brauer-Journal. 1896.
 - Chemie und Physiologie des Malzes und Bieres. Leipzig 1896.
 - Ueber den Nachweis des Zuckers in vergorenem Würzen und den unvergorenen Würzeresten der Hefen Saaz, Froberg und Logos. Bayr. Brauer-Journal. 1896.

- PRIOR, E. — Ueber ein drittes Diastase-Achroodextrin und die Isomaltose. Bayr. Brauer-Journal. 1896.
- PROCHNIK. — Die Leistungsfähigkeit in quantitativer und bakteriologischer Beziehung der aus Kieselguhr hergestellten Filterzellen, System Nordtmeyer-Berkefeld. VII. intern. Congr. hygiene and demography. Londres 1891.
- RABINOWITSCH, L. — Untersuchungen über pathogene Hefenarten. Z. f. Hygiene und Infektionskrankh. XXI. 1895.
- Ueber die thermophilen Bakterien. Z. f. Hygiene und Infektionskrankh. XX.
- RAPP, R. — Einfluss des Sauerstoffes auf gärende Hefe. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. XXIX. 1896.
- RATZ, ST., v. — Ueber die schleimige Milch. Archiv f. Tierheilkunde. XVI. 1890.
- RAUM, JOH. — Zur Morphologie und Biologie der Sprossspilze. Zeitschr. f. Hygiene. X. 1891.
- RAYMANN, B. und KRUIS, K. — Chemisch-biologische Studien. I. (Saccharomyces und Mycoderma). II. (Alkoholgärung und Milchsäuregärung). Prague 1891. 1895.
- REESS. — Botan. Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. 1870.
- Ueber den Soorpilz. Sitzungsber. der. physikalisch-med. Sozietät Erlangen. Botan. Ztg. 1878.
- REICHARD, A. — Ueber Blasengärung. Z. f. d. ges. Brauwesen. XV. 1892.
- Studien über einen Sarcinaorganismus des Bieres. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1894.
- A. und RIEHL, A. — Zur Kenntnis und Bekämpfung der Sarcinakrankheit. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XVIII. Munich 1895.
- REINKE. — Ueber Sarcina. Wochenschr. f. Brauerei. 1885 1886.

- RICHEL. — De la fermentation lactique du sucre de lait. Compt. rend. LXXXVI. 1878.
- De quelques conditions de la fermentation lactique. Compt. rend. ac. sc. LXXXVIII. 1079.
- RIETSCH. — De la possibilité de communiquer divers bouquets aux vins par l'addition dans la cuve à fermentation de levures cultivées. Bull. de la Société d'agriculture, séance 8 févr. 1890.
- ET MARTINAND. — Des micro-organismes que l'on rencontre sur les murs et de leur développement pendant la fermentation. Compt. rend. ac. sc. CXII.
- ET HERSELIN. — Sur la fermentation apiculée et sur l'influence de l'aération dans les fermentations à température élevée. Progrès agricole et viticole. Montpellier 1895.
- ROMMIER, A. — Sur la possibilité de communiquer le bouquet d'un vin de qualité à un vin commun en changeant la levure qui le fait fermenter. Bull. de la Soc. chimique de Paris. Sér. III. Tom. II. 1889.
- RONCALI, D. B. — Sur l'existence des levures organisées dans les sarcomes. Ann. d. Micrographie. VIII. 1896.
- ROTENBACH, F. — Die Dextrin vergärende Hefe, Schizosaccharomyces Pombe und ihre event. Einführung in die Praxis. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. Berlin 1896.
- Die Anwendung spaltpilzfeindlicher Agentien im Brennereibetriebe mit besonderer Berücksichtigung der Kunsthefeführung. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1896.
- ROUX. — Sur une levure cellulaire qui ne sécrète pas de ferment invertif. Bull. de la Soc. chim. XXXV. 1881.
- ROUX. — L'analyse microbiologique des eaux. Paris 1892.
- SALOMON, GORDON. — Cantor Lectures on yeast. Londres 1888.
- SALKOWSKY. — Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. Z. f. phys. Chem. XIII. 1889.
- SANFELICE, F. — Contribution à la morphologie et à la biologie

- des blastomyces qui se développent dans les sucres de divers fruits. Ann. de Micrographie. VI. 1874.
- SANFELICE, F. — De l'action pathogène des blastomycètes. Ann. d'Igiene speriment. V. Centralbl. f. Bakteriologie. XVII. 1895.
- SANGUINETI. — Contribution à l'étude de l'Ammylomyces Rouxii. Ann. Inst. Pasteur. XI. 1897.
- SCHAEFFER. — Sur l'action du Mycoderma vini sur la composition de vin. Ann. de micrographie. III. 1890-91.
- SCHAFFER et FREUDENREICH. — Recherches quantitatives sur les levures et les bactéries des vins naturels et des vins artificiels. Ann. de micrographie. 1892.
- SCHARDINGER, F. — Ueber eine neue, optisch aktive Modification der Milchsäure, durch bakterielle Spaltung des Rohrzuckers erhalten. Monatshefte f. Chemie. XI. 1890.
- Ueber das Vorkommen Gärung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurteilung desselben. Wiener klin. Wochenschr. V.
- SCHAELE, C. W. — Anmärkningar om sättet att conservera ättila (Kungl-Vetenskaps-Academiens nya Handlingar. T. III). Stockholm 1782. Mémoires de Chimie. Dijon 1783.
- SCHIEWECK, O. — Ueber Saké, das Nationalgetränk der Japaner und die bei seiner Bereitung wirksamen Pilze. Beilage zum Jahresbericht der evangelischen Realschule I. Breslau 1897.
- SCHÖNNING, H. — Nouvelle et singulière formation d'ascus dans une levure. Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Labor. IV. Bd. 1. H. 1895.
- Matras pour cultures sur blocs de plâtre. Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Labor. IV. Bd. 2. H. 1896.
- s. Klöcker.

- SCHLEGEL, H. — Ein Versuch mit gezüchteter Weinhefe in der Praxis. Weinbau und Weinhandel. 1891.
- SCHLOESING, TH. — Sur la fermentation en masses du tabac pour poudre. Mém. des Manufactures de l'État. T. II. Livr. 1. 1889.
- SCHMITZ. — Resultate der Untersuchungen über die Zellkerne der Thallophyten. Separat-Abdruck d. Sitzungsber. d. niederrhein. Ges. f. Natur- und Heilkunde. Bonn 1879.
- SCHNELL, A. — Erfahrungen bei der Hefereinzucht und Verwendung reingezüchteter Hefen zur Weingärung. Vortrag geh. auf der Hauptversamml. für angew. Chemie zu Köln am 22. Mai 1894. Weinmarkt 1894. Z. f. angew. Chemie 1894.
- SCHOLL, H. — Beiträge zur Kenntnis der Milchzersetzen durch Mikroorganismen. II. Ueber Milchsäuregärung. Fortschr. d. Medizin. 1860.
- SCHÖNFELD, F. — Ueber die Gärung- und Nachgärungsverhältnisse mit besonderer Berücksichtigung des tatsächlichen Auftretens von Infektion in den obergärigen Brauereien Nord- und Mitteldeutschlands. Wochenschr. f. Br. XII. 1893.
- Das Hefewachstum in der Hauptgärung bei untergäri- gem Bier. Wochenschr. f. Br. 1896.
- Das Infizieren von Flaschenbier durch Sarcina. Wochenschr. f. Br. 1897.
- SCHRÖTER. — Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Cohns Beiträge z. Biologie der Pflanzen. I. Bd. 2. H. 1872.
- SCHUKOW. — Ueber den Säureverbrauch der Hefen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- Gär- und Konkurrenzversuche mit verschiedenen Hefen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896. (Rapport).
- SCHULZ, A. — Ueber den Stickstoffbedarf und den Stoffumsatz des Kahmpilzes (*Saccharomyces mycoderma*). Ann. der Oenologie. VII. 1878.

- SCHULTZ, H. — Zur Lehre von der Arzneiwirkung. Virchows Archiv. Bd. 108. 1887.
- SCHULZE, E. — Versuche über Pasteurisierung von Wein. Mitt. über Weinbau und Kellereiwirtschaft. Geisenheim 1894.
- Die Anwendung des Pasteurisiereus gegen Nachgärungen der Weine auf den Flaschen. Landw. Jahrb. herausgeg. v. Thiel. 1893.
- SCHULZE, FR. — Lehrbuch der Chemie f. Landwirte. II. Bd. 2. Abt. 1860.
- SCHUMACHER. — Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. Sitzungsbericht d. K. K. Akad. d. Wiss. Vienne 1874.
- SCHUPPAN, P. — Milchwirtschaftsbetrieb und Molkereiprodukte im Lichte der Bakteriologie. Pharm. Centralhalle. 1893.
- SCHUPPAN. — Die Bakteriologie in ihrer Beziehung zur Milchwirthschaft. Centr. f. Bacteriologie u. Paras XIII. 1893.
- SCHÜTZENBERGER. — Les fermentations. Paris 1892.
- SCHUURMANS STECKHOVEN. — Saccharomyces Kefyr. Inaug. Diss. Utrecht 1991.
- SCHWACKHÖFER, F. — Ueber reingezüchtete Hefe. Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei und Malzfabrikation. Vienne 1890.
- Beitrag zur Beurteilung des Wassers für die Zwecke der Brauerei und Mälzerei. Mitt. d. österr. Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien, III. 1890.
- SCHWANN. — Vorläufige Mitteilung betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis. Poggend Ann. XLI. 1837.
- SEIFERT, W. — Ueber einen neuen Bestandteil der Traubenbeeren amerikanischer Reben und den Wachskörper derselben. Landw. Vers. Stationen. XLV. 1894.

- SEITER. — Studien über die Abstammung der Saccharomy-
ceten. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II.
1896.
- SEYFFERT, H. — Einiges über Reinzuchthefen und ihre Ernäh-
rung Zeitschrift. f. d. ges. Brauwesen. München. 1896.
- SEYNES, J. de — Sur le mycorderma vini. Compt. rend. ac.
sc. LXVII. 1868. Ann. d. sc. nat. Botanique V.
Série X. 1869. Recherches sur les végétaux infé-
rieurs, 3^e fasc. Paris 1885.
- SLESKIN, P. — Die Kieselsäuregallerte als Nährsubstrat. Cen-
tralbl. für Bakt. u. Paras. X. 1891.
- SOREL, E. — Étude sur l'Aspergillus Oryzae. Compt. rend.
as. sc. Paris. CXXI. 1895.
- SOYKA. — Ueber den Uebergang von Spaltpilzen in die Luft.
Sitzungsber. der math.-phys. Klasse der Akademie
der Wissensch. zu München. IX. 1879.
- STEINER, MORITZ. — Ueber einige Versuche der Vergärung von
australischen Mosten mit Reinhefen. Weinbau und
Weinhandel. XIV. Mayence 1896.
- STEINMETZ, O. — Neuerungen auf dem Gebiete der Essig-
Industrie. Chemiker-Ztg. XVI. 1892.
- STENGLEIN. — Zusammenstellung der Erfahrungen mit Rein-
zuchthefe (Brennerei- und Presshefe). «Alcohol».
Berlin 1893.
- STUEBER. — Ueber die desinfizierende Wirkung von gelöschtem
Kalk auf Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen
München 1896.
- STORCH, V. — Nogle Undersøgelser over Flødens Syrning.
18. Beretning fra den Kgl. Landbohøjskole, Copen-
hague 1890.
- Untersuchungen über Butterfehler und Säuerung des
Rahmes. Milchztg. 1890.
- SUCHSLAND, E. — Ueber das Wesen der Tabakfermentation und
über die sich daraus ergebende Möglichkeit, den
Fermentationsprozess behufs Veredelung der Tabake

- zu beeinflussen. *Period. Mitteil. des Tabak-Vereins*. No. 38. Mannheim 1892.
- SULLIVEAU, J. O'. — (On the influence of yeast on saccharose). *Trans. Inst. of Brewing*. Vol. VI.
- The hydrolytic functions of yeast. Part I und II. *Journ. of the chem. Soc. Trans.* XLI. 1892.
- The specific rotatory and cupric reducing power of invert sugar and of dextrose obtained from cane-sugar by means of invertase. *Journ. of the chem. soc. Trans.* XLI. 1892.
- SWAN. — On the Endospore Formation and general Description of a red yeast. *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.* 2. Abt. II. 1896.
- SYKES, W J. — *The Principles and Practice of Brewing*. Londres 1897.
- THAUSING, J. — Einfluss der Hefegabe auf Hauptgärung, Hefe und Bier. 14. Jahresbericht der ersten österr. Brauerschule in Mödling. 1884.
- Ueber reingezüchtete Hefe. *Allg. Zeitschr. f. Bierbr. und Malz-fabrik*. Vienne 1885.
- Die Theorie und Praxis der Malzbereitung und Bierfabrikation. Leipzig 1898.
- Ueber die Bildung des «Bruches» bei der Hauptgärung. Brauer- und Mälzer-Kalender. II. Teil. Stuttgart 1889-90. *Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen*. München 1890.
- THOMSON, ROB. D. — Ueber die Natur und die chemischen Wirkungen der Essigmutter. *Ann. d. Chemie und Pharmacie*. Bd. 83. 1852.
- TIEGHEM, PH. VAN, ET LE MONNIER. — Recherches sur les Mucorinées. *Ann. de sc. nat. Bot.* 5. sér. T. XVII. 1873.
- Nouvelles recherches sur les Mucorinées. *Ann. des sc. nat. Bot.* 6 sér. T. I. 1875.
- Sur le Bacillus Amylobacter et son rôle dans la putréfaction des tissus végétaux. *Bull. de la Soc. bot. de France*. 1877.

- TIEGHEM, PH. VAN, ET LE MONNIER. — Troisième mémoire sur les Mucorinées. Ann. d. sc. nat. Bot. 6. sér. T. IV. 1878.
- Leucostoc mesenterioides. Ann. de sc. nat. 6 sér. T. VII.
- TOKISHIGE, H. — Ueber pathogene Blastomyceten. Centr. f. Bakt. u. Paras. 1. Abt. XIX. 1896.
- TOLLENS UND STONE. — Ueber die Gärung der Galaktose. Ber. d. d. chem. Ges. XXI. 1888.
- TOLOMEI, G. — Sull'azione della luce sulla fermentazione acetica. Staz. specim. agrar. ital. XX. 1891.
- TRAUBE. — Theorie der Fermentwirkungen. Berlin 1858. Ber. d. d. chem. Ges. 1874, 1876.
- TROUESSART, E. L. — Les microbes, les ferments et les moisissures. Paris 1891.
- TULASNE. — Selecta fungorum carpologia. Paris 1861.
- TURPIN. — Mémoire sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acéteuse. Compt. rend. ac. sc. VII. 1838.
- TYNDALL. — Further researches on the deportment and vital persist. of putrefact. and infect. organisms. Londres 1878-79.
- Essays on the floating matter in the air in relation to putrefaction and infection. Londres 1881.
- UDRANSKY, L. — Studien über den Stoffwechsel der Bierhefe. I. Beitr. zur Kenntnis der Bildung des Glycerins bei der alkoholischen Gärung. Zeitschrift. für physiologische Chemie. XIII. 1889.
- UFFELMANN, J. — Verdorbenes Brot. Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk. VIII. 1890
- VAN DAM, L. — Étude sur un bacille visqueux des bières anglaises. Bull. de l'assoc. des anc. élèves de l'École de Brasserie, Louvain. I. Nr. 3. 1896. Bull. de l'assoc. belg. d. chim. 1895.
- VELTEN. — Conférence. Revue universelle de la brasserie et malterie. 1888.

- ILLIERS, A. — Sur la transformation de la fécula en dextrine par l'action du ferment butyrique. Compt. rend. ac. sc. CXII. 1891.
- Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique. Compt. rend. ac. sc. CXII. 1892.
- Sur le mode d'action du ferment butyrique dans la transformation de la fécula en dextrine. Compt. rend. ac. sc. CXIII. 1891.
- VODERMANN. — Melassegärung. Geneesk. Tijdschr. v. Nederl. Indie. 1893.
- VUYLSTEKE. — Contribution à l'étude des Saccharomyces fermentant en concurrence. (Ann. de micrographie. II. 1889. En allemand dans Zeitschr. für das ges. Brauw 1888-1889. Munich).
- WARMING, E. — On nogle ved Danmarks Kyster levende Bakterier. (Schwefelbakterien). Copenhagen 1876.
- WEHMER, C. — Ueber Citronengärung. Sitzungsber. d. Kön. Preuss. Akad. der Wissensch. zu Berlin. 1893.
- Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze. I. Zwei neue Schimmelpilze als Erreger einer Citronensäuregärung. Mit 2 Taf., 1 Holzschnitte und 1 Tabelle. Hanovre et Leipzig 1893.
- Ueber die Verflüssigung der Hefe durch Pilze Chemiker Ztg. 1895.
- Sakébrauerei und Pilzverzuckerung. Centr. f. Bakt. u. Paras. I. B. 15-16. 1895.
- Zur Frage nach dem Wert der einzelnen Mineralsalze für Pilze. Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. XIII. 1895.
- Aspergillus Oryzæe, der Pilz der Japanischen Saké-Brauerei. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. 1. 1895.
- Aspergillus Wentii, eine neue technische Pilzart Javas. Centralbl. 1. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- Einige vergl. Versuche über das antiseptische Verhal-

- ten der Benzoësaure und ihrer drei isomeren (Mono-) Oxy-sauren. Chem. Ztg. XXI. 1897.
- WEIGMANN, H. — Der Zweck und die Aufgaben der bakteriologischen Abteilung der milchwirtschaftlichen Versuchsstation in Kiel. Milchzeitung 1889.
- Ueber bittere Milch. Milchzeitung XIX. 1890.
 - Zur Säuerung des Rahmes mittels Bakterienreinkulturen. Landw. Woch. f. Schlesw.-Holst. 1890.
 - Neue Mitteilungen über Rahmsäuerung mittels Reinkulturen von Säurebakterien. Milchzeitung XIX. 1890.
 - Erfahrungen über die Rahmsäuerung mit Bakterienreinkulturen. Landw. Woch. f. Schlesw.-Holst. 1892
 - UND ZURN, Ueber «scifige» Milch. Centr. f. Bakt. u. Paras. XV. 1894.
 - Ueber den jetzigen Stand der bakteriologischen Forschung auf dem Gebiete des Käsereifungsprozesses. Centr. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- WENT, F. EN PRINSEN GEERLIGS. — Over Suiker — en Alcoholvorming door organismen. Archief voor de Java-suikerindustrie. 1894. Kgl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. Ser. II. Teil. 4.
- Beobachtungen über die Hepearten und zuckerbildenden Pilze der Arrackfabr. Verh. d. K. A. d. w. te Amsterdam. II. 4 (1895. Tirage à part).
- WERMISCHEFF. — Recherches sur les microbes acétifiants. Ann. Inst. Pasteur. VIII. 1897.
- WICHMANN, H. — Die Hefereinkultur und die Bakterienfrage. Mitteilungen der österreichischen Versuchs-Station für Brauerei und Malzerei in Wien. I. H. 1888.
- UND ROHN, S. Ueber Bierfiltration. Ibidem.
 - Ueber Wasserfiltration. Mitt. österr. Vers.-St. f. Brau. V. Vienne 1892.
 - Biologische Untersuchungen des Wassers für Brauereizwecke. Ibidem V. 1892.

- WICHMANN, H. — Neure Hefe-Reinzucht-Apparate. Mitt. österr. Vers.-Station f. Brauerei u. Mälzerei. VI. Vienne 1894.
- WIESNER. — Bedeutung der technischen Rohstofflehre (techn. Warenkunde) als selbständiger Disziplin und über deren Behandlung als Lehrgegenstand an techn. Hochschulen. Dingers polytechnisches Journal. Bd. 237. 1880.
- Untersuchungen über den Einfluss, welchen Zufuhr. und Entziehung von Wasser auf die Hefezellen aussern. Sitzb. der Wiener Akademie. Bd. 59. 1889.
- WIJSMANN, H. P. — Ueber den Stickstoffgehalt von *Saccharomyces ellipsoideus*. Vortrag. Utrecht. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. 1891.
- WILHELM, K. A. — Beiträge zur Kenntnis der Pilzgattung *Aspergillus*. (Inaug. Diss. Strasbourg. Berlin 1877.
- WILL, H. — Wie wird reine Hefe gezüchtet? Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich. 1885.
- Ueber einige für die Brauindustrie wichtige Hefenarten und deren Unterscheidungsmerkmale. Allg. Brauer- und Hopfenztg. 1885. Festnummer.
- Ueber Sporen- und Kahlhautbildung bei Unterhefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1897.
- Ueber das natürliche Vorkommen von Sporenbildung in Brauereien Z. f. d. ges. Brauw. 1887.
- Untersuchungen über die Mikroorganismen der Tropfsäcke. Ber. der Wiss. Stat. Munich 1887.
- Ueber eine wilde Hefe, welche dem Biere einen bitteren Geschmack giebt. Ber. d. wissensch. Stat. Munich 1889.
- Beschreibung von zwei Krankheitshefen. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1890.
- Zwei Hefearten, welche abnorme Veränderungen im Bier veranlassen. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1891.

- WILL, H.—Untersuchungen über die Verunreinigung gebrauchter Trubsäcke. Mitt. d. wissenschaftl. Station f. Brauerei. Munich. Zeitschr. f. d. g. Brauwesen. 1892.
- Notiz betr. der Nachweis von wilden Hefenarten in Brauereihefen und Jungbieren sowie das Vorkommen von Sacch. apiculatus in denselben. Z. f. d. g. Brauwesen. 1893.
 - Ueber die Wirkung einiger Desinfektionsmittel auf Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich. 1893-1894.
 - Die braunefarbtten Ausscheidungen (Hopfenharz-Aussch.), welche der Bierhefe beigemengt sind, deren Bau im normalen und abnormalem Zustand, sowie deren Beschaffenheit. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1894.
- WILL, R. — Ein Beitrag zur Kenntnis der sogen. «Glutinkörperchen» in der Würze, im Bier und in der Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1894.
- Zur Untersuchung hefentrüber Biere. Forschungsber. über Lebensmittel, 1. Jahrg. Heft 10. Munich 1894.
 - Vergleichende Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Munich 1895. Centralbl. f. Bact. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
 - Einige Beobachtungen über die Lebensdauer getrockneter Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich 1896.
 - Die Methoden, welche bei der Reinzüchtung von Hefe und ähnlichen Organismen durch Einzellkultur auf festem Nährboden zur Feststellung der Lage der ausgewählten Zellen in den Kulturen zur Anwendung kommen. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 2. Abt. II. 1896.
- WILSON, W. R. — Pure yeast culture in London. The Brewers Journal. Londres 1892.
- WINDISCH, W. — Ueber die Desinfektion von Räumen durch gasförmigen Formaldehyd. Zeitschr. f. Spiritusind. XVIII. 1895.

- WINDISCH, W. — Sterilisierung von Kellern, Tennen, Fassern u. s. w. mittels Dampfen von Formaldehyd, sowie das Verhalten des Formaldehyds gegen Hefen und Bakterien. Wochenschr. f. Brauerei. 1894.
- WINOGRADSKY. — Ueber die Wirkung äusserer Einflüsse auf die Entwicklung von *Mycoderma vini*. Bot. Centralbl. Bd. XX. 1884.
- Ueber Schwefelbakterien. Botan. Zeit. 1886.
 - Recherches physiologiques sur les sulfobactéries. Ann. Inst. Pasteur. III. 1889.
 - Recherches sur les organismes de la nitrification. 4. et 5. mémoire. Ann. Inst. Pasteur. V. 1891.
 - Sur la formation et l'oxydation des nitrites pendant la nitrification. Compt. rend. as. sc. CXIII. 1891.
 - Fixation par les microbes de l'azote libre de l'atmosphère. Arch. des sc. biolog. de l'Inst. Imp. de médecine de St-Petersbourg. III.
- WITTELSHÖFER, P. — Milchsäure- oder Flusssäurehefe. Z. f. Spir.-Ind XVIII.
- WOODHEAD. — Bacteria and their Products. Londres 1891.
- WORTMANN, J. — Unters. über das diast. Ferment der Bakterien. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. VI. 1882.
- Untersuchungen über das sogen. «Umschlagen» des Weines. Ber. d. Kgl. Lehranstalt für Obst- und Weinbau in Geisenheim. 1891-92.
 - Einige Bemerkungen über die Vergärung von Mosten mit reingezüchteter Hefe. Weinbau u. Weinh. 1892.
 - Weiteres über die Vergärung von Mosten mit reingezüchteten Hefen. Weinbau u. Weinh. 1892.
 - Untersuchungen über reine Hefen. I. Landw. Jahrb. v. Thiel, p. 901. Berlin 1892.
 - 1. Reinzüchtung verschiedener Rassen von Weinhefe; Versuche über die Gärthätigkeit derselben und ihre Anwendung in der Praxis. 2. Weitere Gärversuche

mit reingezüchteten Weinhefen. In Ber. d. Kgl. Lehranstalt für Obst- und Weinbau zu Geisenheim a. Rh. Wiesbaden 1893.

WORTMANN, J. — Ueber die Verwendung von reinen Weinhefen bei der Apfelweibereitung. Weinbau u. Weinh. 1893.

- Ueber die Anwendung von reingezüchteten Hefen bei der Schaumweibereitung. Weinbau u. Weinh. 1893.
- Mitteilung über die Verwendung von konzentriertem Most für Pilzkulturen. Botan. Zeit. 51. Jahrg. 1893.
- Die Verwendung und Bedeuteng reiner Hefen bei der Weibereitung. Ber. über die Verhandl. d. deutschen Weinbauversins in Neuenahr. Sept. 1893. Mayence 1894.
- Die seitherigen Erfahrungen der Praxis mit reinen Hefen und die Konsequenzen, welche sich hieraus für die Züchtung, sowie die Anwendung der Reinhefen ergeben. Vortrag, geh. auf dem 13. deutschen Weinbaukongress in Mainz 1894. (Weinbau u. Weinh. Mayence 1894).
- Untersuchungen über reine Hefen. II. Landw. Jarhb. Berlin 1894.
- Recension von Chudiakows Untersuchungen über die alkoholische Gärung. Botan. Zeit. 1894.
- Untersuchungen über den Einfluss des Lüftens, sowie der dauernden Gärthatigkeit auf den Charakter der Hefen. Weinbau u. Weinh. Mayence 1895.
- Ueber den Einfluss der Hefemenge auf den Verlauf der Gärung, sowie auf die quantitativen Verhältnissen der Gärprodukte. Weinbau u. Weinh. Mayence 1895.
- Anwend. u. Wirkung reiner Hefen in der Weibereitung. Berlin 1895.
- Ueber einige in den Domanial-Kellereien zu Eberbach im Herbst 1896 unter Verwendung von Reinhefe ausgeführten Gärversuche. Weinbau und Weinh. 1897.

- WORTMANN, J. — Neue Konstr. eines Gärverschlusses. Botan. Zeit. LIV. Nr. 21 1897.
- Ueber das Verkapseln und Verkorken der Weinflaschen. Weinbau u. Weinh. Mars 1897.
 - Ueber Säureabnahme im Wein. Centr. f. Bakt. u. Paras 2. Abt. III. 1897.
 - Ueber künstlich hervorgerufene Nachgärungen von Weinen in der Flasché und im Fasse. Landw. Jahrb. 1897.
- WURM, EMANUEL. — Essigbildung mittels Bakterien. Dinglers. Polyt. Journ. Bd. 235. Jahrb. 1880.
- YUNG. — Des poussières organisées de l'atmosphère. Arch. des. sc. phys. et nat. IV. Genève 1880.
- ZALESWKY. — Ueber Sporenbildung in Hefezellen. Verh. d. Krakauer Akad. d. Wiss. Math.-naturw. Sektion I. XII. 1885.
- ZEIDLER, A. — Beiträge zur Kenntnis einiger in Würze und Bier vorkommenden Bakterien. Wochenschr. f. Brauerei. 1890.
- Ueber eine Essigsäure bildende Termobakterie. Centr. f. Bakt. u. Par. 2. Abt. II. 1896.
- ZIMMERMANN, O. E. R. — Bakteriologische Diagnostik. Chemnitz.
- Die Bakterien unserer Frink- and Nutzwasser, insbesondere der Chemnitzer Wasserleitung. 1. II. (Berichte der naturwiss. Ges. Chemnitz). Chemnitz 1890. 1894.
 - Die Peronespora-Krankheit des Weinstocks. Centr. f. Bakt. u. Paras. II. 1887.
- ZOPF, W. — Entwicklungsgeschichtl. Untersuchungen über Crenothrix polyspora. Berlin 1879.
- Ueber den genetischen Zusammenhang des Spaltpilzformen. Sitzungsber. d. Berl. Akad. d. Wiss. 1881.
 - Zur Morphologie der Spaltpflanzen. Leipzig. 1882.

- ZOFF, W. — Ueber *Bacterium merismopedioides*. Sitzungsber. des bot. Vereins d. Prov. Brandenburg. Juin 1882.
- Die Spaltpilze. Breslau. 3. Ausg. 1885.
- Oxalsauregärung (an Stelle von Alkoholgärung) bei einen typischen (endosporen) Saccharomyceten, *Sacch. Hansenii* n. spec. Bericht d. d. botan. Gesellsch. VII, 2. 1889.
- Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung. (Encyclopædie der Naturwiss. 1. Abt. 1. Teil. Handb. der Botanik, herausg. v. Schenk. Bd. IV, p. 271-781). Breslau 1890. A paru aussi comme un livre à part.
- s. Liesenberg.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE PREMIER

	Pages.
PRÉFACE.	1
RECHERCHES MICROSCOPIQUES ET PHYSIOLOGIQUES.	1
1. — Préparations microscopiques, colorations et analyses microchimiques des sécrétions, des bactéries et des levures	1
2. — Etudes de morphologie et d'évolution à la table du microscope ; chambres humides ; des cultures abso- lument pures en masse.	7
3. — Stérilisation (Spallanzani, Scheele, Appert, Schulze, Schwann, Mitscherlich, Cagniard Latour, Kützing, Turpin, Schroeder, Dusch, Pasteur) : a , stérilisation d'objets en verre et en métal ; b , stérilisation des liquides nourriciers et milieux nourriciers solides (filtration de la bière et de l'eau, pasteurisation de la bière, du vin etc. ; appareils clos pour le refroidis- sissement et l'aération) ; c , stérilisation de l'air .	12
4. — Désinfection (Schwann, Koch, Gruber, Johan-Olsen, Aubry, Will).	18
5. — Ballons, flacons et récipients (systèmes Pasteur, Chamberland, Freudemeich, Hansen, Joergensen et de Carlsberg)	24
6. — Milieux nourriciers	29
7. — Préparation de la culture pure.	31
a . — Cultures pures pour les études du dévelop- pement et pour les recherches morpho- logiques (Ehrenberg, Mitscherlich, Küt- zing, F. Schulze, Tulasne, De Bary, Bre- feld)	32

b. — Cultures pures pour expériences physiologiques sur des cultures en masse (Pasteur, Cohn, Lister, Hansen, Schroeter, Koch)	33
a. — Méthodes physiologiques (examen expérimental des procédés de Pasteur et d'Effront).	34
b. — Méthodes de dilution (les méthodes exactes de Hansen ; examen expérimental des cultures sur des plaques de gélatine de Koch).	37
8. — Détermination du nombre des cellules de levure.	44

CHAPITRE II

ANALYSES DE L'AIR ET DE L'EAU	48
Spallanzani, Tyndall, Pasteur, Miquel, Koch, Hesse, Hueppe, v. Schlen, Frankland, Petri, Hansen.	49
Analyse zymotechnique de l'air de Hansen	58
Analyses zymotechniques de l'eau de Holm et Joergensen.	61
Méthode de Hansen pour l'analyse zymotechnique de l'air et de l'eau	65

CHAPITRE III

LES BACTÉRIES	67
Formes.	67
Organisation anatomique, matières colorantes, bactéries luisantes, mouvement.	68
Multiplication, formes de croissance, bactéries endospores et asthrospores, zoogloes	71
Températures, lumière, agitation mécanique.	74
Anaérobies et aérobies.	75
1. — Bactéries acétiques.	75
2. — Bactéries lactiques.	88
3. — Bactéries butyriques	98
4. — Bactéries aleoogènes	104

5. — Organismes du Képhir et de la bière de gingembre	105
6. — Bactéries visqueuses	111
7. — Bactéries à action intervertissante, diastatique et peptonisante	117
8. — Formes de Sarcina	118
9. — Crenothrix, Sulfobactéries, bact. nitrifiantes.	123

CHAPITRE IV

LES MOISSISSURES	126
Leur habitat et leur dissémination	127
1. — <i>Botrytis cinera</i>	128
2. — <i>Penicillium glaucum</i>	132
3. — <i>Eurotium Aspergillus glaucus</i> , <i>Asp. fumigatus</i> , <i>A. Niger</i>	136
4. — <i>A. Oryzæ</i> , <i>A. Wentii</i>	140
5. — <i>Mucor</i> , <i>M. Mucedo</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>M. erectus</i> , <i>M. cirréinelloïdes</i> , <i>M. spinosus</i> , <i>M. stolonifer</i> , <i>M. Amylomyces Rouzû</i> , <i>Chlamydomucor Oryzac.</i>	142
6. — <i>Monilia candida</i>	150
7. — <i>Oïdium lactis</i>	154
8. — <i>Fusarium</i>	157
9. — <i>Chalara</i> <i>Mycoderma</i>	158
10. — <i>Dematium</i>	158
11. — <i>Cladoporium herbarum</i>	161
<i>Oïdium Tuckeri</i>	162
<i>Peronospora viticola</i>	162

CHAPITRE V

LES FERMENTS ALCOOLIQUES.	165
Introduction	165
Levures-Saccharomyces	166
Observations antérieures de Schwann, De Seynes, Reess. De Bary, Engel et Brefeld.	166
Pasteur et ses devanciers	167

Sa polémique avec Liebig	168
Opinions de Pasteur sur les organismes de la fermentation, sa théorie de la fermentation, et sa polémique avec Brefeld et Traube, système de Hansen.	168
Essais d'aération de Pedersen, Hansen et Buchner	174
Critique de Nægeli, Brown et Hueppe de la théorie de la fermentation de Pasteur, Théorie de Nægeli.	174
Iwanovsky	177
Giltry et Abersson	178
Théorie d'Émile Fischer.	178
C. J. Lintner, Prior.	180
Ed. Buchner.	181
Rayman et Kruis.	181
<i>Recherches de Hansen.</i>	183
Remarques générales.	183
1. — Préparation de la culture pure.	184
2. — L'analyse	186
a. — Image microscopique de la levure déposée.	187
b. — La formation des ascospores (analyse de la le- vure de brasserie etc.).	188
c. — La formation des voiles	204
d. — Les limites des températures pour les espèces de Saccharomyces	211
e. — Culture sur milieu nourricier solide.	214
f. — Action des Saccharomyces et des levures ressem- blant aux Saccharomyces sur les sucres et les autres constituants du liquide nourricier. Ma- ladies de la bière.	216
g. — Des variations dans les différentes espèces de Saccharomyces.	230
h. — Formation mucilagineuse des levures.	239
Structure et constitution de la cellule de levure.	241
Classification des Saccharomyces	243
<i>Saccharomyces cerevisia</i> I.	245
<i>Saccharomyces Pastorianus</i> I.	249

<i>Saccharomyces Pastorianus</i> II.	252
<i>Saccharomyces Pastorianus</i> III.	254
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> I.	258
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> II.	261
Deux autres levures ellipsoïdales.	263
<i>Saccharomyces Illicis</i>	264
<i>Saccharomyces Aquifolii</i>	264
<i>Saccharomyces pyriformis</i>	265
<i>Saccharomyces Vordermanni</i>	265
<i>Saccharomyces Marzianus</i>	265
<i>Saccharomyces exiguus</i> (Reess)	267
<i>Saccharomyces Joergensenii</i>	268
<i>Saccharomyces membranæfaciens</i>	269
<i>Saccharomyces Hansenii</i>	270
<i>Saccharomyces Ludwigii</i>	271
<i>Saccharomyces octosporus</i>	273
<i>Saccharomyces Comesii</i>	277
<i>Saccharomyces Pombe</i>	277
<i>Saccharomyces Mellacci</i>	279
<i>Saccharomyces acidi lactici</i>	281
<i>Saccharomyces fragilis</i>	282
<i>Saccharomyces minor</i>	284
Fermentation panaire	284
<i>Saccharomyces anomalus</i>	285
<i>Saccharomyces conglomeratus</i>	287
<i>Saccharomyces guttulatus</i>	288
Levures pathogènes	289
Levure de culture.	290
Levure basse n° I et n° II de Carlsberg.	291
Description de Will de quatre levures de fermentation basse	294
Groupement des races de levure de brasserie au point de vue pratique.	295
Observations de Irmisch.	297
Levures de distillerie, levures pressées, levures de mélasse ; types différents	298

Autres champignons bourgeonnants	300
<i>Torula</i>	300
<i>Saccharomyces apiculatus</i>	308
<i>Mycoderma cerevisiæ</i> et <i>vini</i>	315

CHAPITRE VI

L'APPLICATION PRATIQUE DES RÉSULTATS DES RECHERCHES SCIENTIFIQUES	321
Technique de la stérilisation développée par les anciennes recherches sur la génération spontanée. Conséquences pratiques de ces recherches. Spallanzani, Scheele, Appert, Schröder, Dusch.	321
Période de Pasteur. Démonstration que les bactéries peuvent provoquer des maladies dans les liquides qui fermentent. Oxydation du moût de bière. Expériences d'aération. Procédé manqué pour la purification de la levure	322
Système de Hansen et réforme qui en résulte. Maladies de la bière provoquées par des levures. Différentes espèces de <i>Saccharomyces cerevisiæ</i> . Culture pure de la levure de brasserie. Constance des caractères des différentes espèces de levures dans la pratique. Préparation de variétés des levures. Méthode pour l'analyse pratique de la levure. Appareils propagateurs pour la levure. Ballons servant à l'expédition de la levure. Conservation de la culture pure.	323
Rapports sur les résultats obtenus par les recherches de Hansen (C. Lintner, Aubry, Will, Reinke, Bétouhoubek, Bunge-ner, C. J. Lintner, Frankland, Mac Cartie, De Bavay, Kokosinski, Wilson, Wortmann).	337
Installation de laboratoires particuliers. Effet produit par les travaux de Hansen sur la laiterie, la fermentation du tabac.	354
RÉSUMÉ.	354
BIBLIOGRAPHIE	355