

# Bactéries lactiques isolées de macérations de cerises

Autor(en): **Schweizer, Ch. / Schaffer, F.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **13 (1922)**

Heft 5-6

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-984090>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

## LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT

## TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE

---

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 10. — per Jahrgang. — Suisse fr. 10. — par année.

Preis einzelner Hefte Fr. 1. 80. — Prix des fascicules fr. 1. 80.

---

BAND XIII

1922

HEFT 5/6

---

### Bactéries lactiques isolées de macérations de cerises.

Par Ch. SCHWEIZER.

(Travail exécuté au laboratoire du Service fédéral de l'Hygiène publique,  
Chef: F. Schaffer.)

---

En même temps que les levures, nous<sup>1)</sup> avons isolé un certain nombre de bactéries des macérations de cerises. Nous allons décrire ici les microbes lactiques qui ont été trouvés dans ces milieux.

Pour la détermination des bactéries, le «Committee on the Chart for identification of Bacterial Species of the Society of American Bacteriologists»<sup>2)</sup> recommande de faire tout d'abord la distinction suivante:

Série I. Organismes qui se développent bien en 24 heures dans du bouillon à glucose à la température de 37°.

Série II. Organismes qui ne se développent pas bien dans les conditions précédentes, mais qui le font en 48 heures à 25°, également dans du bouillon à glucose.

Série III. Organismes qui préfèrent un milieu solide et non sucré, c'est-à-dire qui se développent bien sur du bouillon gélosé en 24 heures à la température de 37°.

Série IV. Organismes qui ne se rangent pas dans les séries précédentes, mais qui se développent facilement à la surface du bouillon gélosé, en 48 heures à la température de 25°.

Ceci a pour but de connaître approximativement les exigences des microbes à étudier.

---

<sup>1)</sup> Ann. Inst. Pasteur, **35**, p. 820 (1921) et Trav. de Chim. alim. et d'Hyg., **12**, p. 289 (1921).

<sup>2)</sup> Voir: Tanner, Bacteriology and Mycology of foods, 1<sup>re</sup> éd., p. 108 (1919).

Pour les microbes lactiques,  *Beijerinck*<sup>3)</sup> a établi un certain nombre de caractères généraux:

1<sup>o</sup> Ils sont immobiles;

2<sup>o</sup> Ils constituent des anaérobies facultatifs;

3<sup>o</sup> Ils ne forment pas de spores;

4<sup>o</sup> Ils exigent des hydrates de carbone déterminés et de l'azote peptonisé, ou de préférence tryptonisé;

5<sup>o</sup> Ils forment des petites colonies sur milieu nutritif solide, alors que dans le moût de bière la quantité de matière microbienne produite est relativement grande;

6<sup>o</sup> Ils forment aux dépens des sucres attaqués, d'après l'espèce de bactérie, soit de l'acide lactique, soit, en outre d'une quantité dominante d'acide lactique, une dose déterminée d'acide volatil et des doses toujours proportionnelles à ce dernier d'alcool et d'anhydride carbonique;

7<sup>o</sup> Ils sont dépourvus de catalase; ce caractère négatif semble être très spécifique pour les bactéries lactiques, car d'après  *Beijerinck* tous les autres microbes provoquent la décomposition de l'eau oxygénée.

*von Freudenreich et Thöni*<sup>4)</sup> ont en outre observé les caractères suivants:

8<sup>o</sup> Ils se colorent d'après la méthode de  *Gram*;

9<sup>o</sup> Ils ne réduisent pas les nitrates.

Pour l'identification des espèces nous avons établi:

1<sup>o</sup> La  *morphologie*, en examinant la forme et les dimensions des cellules jeunes, ainsi que leur mode de végétation. En outre nous les avons colorées par la méthode de  *Gram* et constaté l'absence de spores et le manque de mobilité.

2<sup>o</sup> Pour la culture en  *milieu liquide* nous nous sommes servi de bouillon comme milieu le plus généralement employé. Les bactéries lactiques étant favorisées par la présence de sucre, nous avons également fait des cultures dans du bouillon additionné de 2% de dextrose et dans du moût de bière. D'après  *van Steenberge*<sup>5)</sup>, l'aspect du trouble provoqué dans la culture en moût de bière permet de diviser les microbes lactiques en deux groupes:

I<sup>o</sup> Les microbes lactiques floconneux. La production de flocons peut se faire soit par agrégation des cellules, soit par accroissement des cellules qui en s'enroulant donnent naissance à de grands flocons.

II<sup>o</sup> Les microbes lactiques non floconneux ou de la tourne. Quand on imprime un mouvement giratoire aux cultures en milieu liquide de ces espèces de microorganismes, les cellules se meuvent dans le liquide

<sup>3)</sup> Arch. néerl. des Sc. ex. et natur. 1901 et 1907; cité d'après Van Steenberge, Ann. Inst. Past., 34, p. 803 (1920).

<sup>4)</sup> Annuaire agricole de la Suisse, 18, p. 531 (1904).

<sup>5)</sup> Annales de l'Institut Pasteur, 34, p. 803 (1920).

suivant le sens de leur longueur et y provoquent des ondes soyeuses, ce que l'on désigne comme phénomène de la tourne.

3<sup>o</sup> Pour la culture en *plaque* nous avons pris du bouillon gélosé et du moût de bière gélosé. Après huit jours on a observé la forme, les dimensions et la couleur des colonies.

4<sup>o</sup> Les mêmes milieux ont servi à la culture en *strie*. On y a examiné le relief, la largeur, la couleur, l'aspect de la surface et les bords de la colonie.

5<sup>o</sup> La culture en *piqûre* a été faite dans du moût de bière non houblonné à 10<sup>o</sup> Balling, solidifié par de la gélatine. Nous avons noté l'aspect de la piquûre et de la végétation qui s'étale à la surface du milieu, ainsi que la formation de gaz à l'intérieur du milieu.

6<sup>o</sup> *von Freudenreich* et *Thöni* attachant un certain intérêt à la culture sur tranches de *pommes de terre*, nous y avons également étudié l'aspect et la couleur de la végétation, ainsi que les changements que subit la couleur de la pomme de terre.

7<sup>o</sup> Le plus important des *caractères biochimiques* de ces microbes est l'acidification. Pour étudier ce phénomène, nous avons inoculé chaque espèce dans 150 cm<sup>3</sup> de moût de bière blonde, non houblonné, et d'une concentration de 10<sup>o</sup> Balling (correspondant à une densité de 1,040 = 10,3 p. 100 d'extrait). Après avoir fermé hermétiquement les flacons, on les a abandonnés pendant 30 jours à la température de 30<sup>o</sup>. Après ce laps de temps nous avons procédé au dosage de l'acidité totale et de l'acidité volatile, en faisant en même temps une détermination de la concentration des ions atteinte. Nous avons fait cette détermination qu'approximativement en nous basant sur la méthode colorimétrique à indicateurs unicolores de *Michaelis*<sup>6</sup>). Comme réactifs, on se sert des solutions suivantes:

A. Solutions d'indicateurs:

- a) Solution saturée d'*α*-dinitrophénole dans de l'eau distillée;
- b) Solution à 0,1% de p-nitrophénole dans de l'eau distillée;
- c) Solution à 0,3% de m-nitrophénole;
- d) Solution de 0,1 g de phénolphthaléine dans 75 cm<sup>3</sup> d'alcool + 175 cm<sup>3</sup> d'eau distillée.

B. Solution d'alcali obtenue en diluant 8—10 cm<sup>3</sup> de soude caustique normale à 200 cm<sup>3</sup>, avec de l'eau distillée.

C. Dilutions d'indicateurs obtenues en diluant 2 cm<sup>3</sup> de chaque solution d'indicateur (A) avec 18 cm<sup>3</sup> de la solution alcaline (B).

D. Tubes d'indicateurs obtenus en remplissant des éprouvettes de diamètres égaux avec les quantités suivantes de solution d'indicateur dilué à 1:10 (C)

<sup>6</sup>) Ztschr. für Immunitätsforschung, **32**, p. 194 (1921).

Phénophtaléine	m-nitrophénole	p-nitrophénole	$\alpha$ -dinitrophénole
	5,2 cc = p <sub>H</sub> 8,4	1,35 cc = p <sub>H</sub> 6,4	7,0 cc = p <sub>H</sub> 4,5
6,5 cc = p <sub>H</sub> 10,0	3,0 » = » 8,0	0,6 » = » 6,0	5,1 » = » 4,1
4,5 » = » 9,6	1,5 » = » 7,6	0,25 » = » 5,6	3,5 » = » 3,7
2,1 » = » 9,2	0,6 » = » 7,2	0,1 » = » 5,2	1,7 » = » 3,3
0,7 » = » 8,8	0,3 » = » 6,8	0,04 » = » 4,8	0,4 » = » 2,7

et en complétant à 7 cm<sup>3</sup> avec la solution d'alcali diluée (B).

La couleur de ces tubes correspond alors à p<sub>H</sub> indiqué dans ce tableau ci-dessus.

Ces tubes peuvent être conservés pendant assez longtemps, sans que les indicateurs soient altérés, pourvu qu'on les garde à l'abri de la lumière et de la chaleur, et que l'on ferme ces éprouvettes hermétiquement.

L'exécution de la détermination de p<sub>H</sub> se fait à 18° dans le comparateur de *Walpole*<sup>7)</sup>, en plaçant dans une éprouvette, de diamètre égal à celui des tubes d'indicateurs, 2 cm<sup>3</sup> du liquide à étudier avec 4 cm<sup>3</sup> de solution physiologique de chlorure de sodium (0,85%) et 1 cm<sup>3</sup> de solution d'indicateur non dilué (A). Derrière ce tube se place une éprouvette ne contenant que de l'eau. A côté de ces deux tubes on place un tube de même diamètre, contenant 2 cm<sup>3</sup> du liquide à examiner avec 5 cm<sup>3</sup> de solution de chlorure de sodium, devant le tube à indicateur. Ce dernier est échangé jusqu'à concordance des couleurs. Il va sans dire que l'indicateur que l'on ajoute au milieu à étudier doit être le même que dans le tube d'indicateur à comparer.

Avec l'acidité volatile nous avons en même temps dosé l'alcool et nous avons noté s'il y avait formation d'anhydride carbonique ou non. La quantité de ce gaz pouvant être extrêmement minime, nous nous sommes servi du moyen que *van Steenberge*<sup>8)</sup> a indiqué pour des cas douteux et qui consiste à plonger précipitamment dans la culture un gros fil de platine chauffé au rouge. Dans le cas de présence d'anhydride carbonique il se produit dans le liquide un bruissement doux avec échappement de gaz le long du fil, de façon à provoquer autour du fil de platine à la surface du liquide une mousse plus ou moins étendue suivant que la culture contient plus ou moins de gaz. S'il n'y a pas présence de gaz il se produit au contraire un bruissement aigu, sifflant et il ne se forme aucune mousse.

Pour connaître la température optima d'acidification, des tubes contenant 10 cm<sup>3</sup> de moût de bière stérile à 10° Balling furentensemencés respectivement par chaque espèce et placés aux différentes

<sup>7)</sup> Voir: *Dernby*, *Ann. Inst. Past.*, **35**, p. 284 (1921).

<sup>8)</sup> *Ann. Inst. Past.*, **34**, 827 (1920).

températures d'examen. Dans les mêmes conditions, nous avons également étudié l'acidification de différents sucres, de la mannite et du lait, en observant en même temps dans ce dernier milieu si le phénomène de la coagulation se produit. Les acidités ont toujours été exprimées par le nombre de centimètre-cubes d'alcali normal nécessaires à la neutralisation de 100 cm<sup>3</sup> de culture, avec la phénolphtaléine comme indicateur.

Nous avons enfin recherché la présence de la catalase, en suspendant un peu de la masse bactérienne dans de l'eau oxygénée à 1%.

En ce qui concerne la *classification* des microbes lactiques, *Beijerinck*<sup>9)</sup> les classa au point de vue morphologique en lactocoques et lactobacilles ou *Lactobacterium*. Pour les espèces de chacun des deux groupes respectivement la forme de leurs cellules, variable avec les conditions de culture, n'est qu'une donnée de plus, utile à leur identification. Ceci a surtout été démontré d'une manière classique par *Burri et Staub*<sup>10)</sup> pour le *Bacterium casei*  $\varepsilon$  *von Freudenreich*, et *van Steenberghe*<sup>11)</sup> l'a confirmé pour un grand nombre d'autres représentants de ce groupe physiologique. A ce dernier auteur nous devons en outre une étude détaillée sur les lactobacilles, qui nous a permis de tracer la table dichotomique suivante pour les *Lactobacterium*:

1<sup>o</sup> *Groupe des Lactobacterium floconneux* (clarification complète du moût de bière après peu de temps).

A. Non producteurs de CO<sub>2</sub> (= microbes lactiques vrais, donnant exclusivement de l'acide lactique).

1<sup>o</sup> N'acidifie pas ni lactose ni lait: *Lactobacterium filatim*.

2<sup>o</sup> Acidifient bien lactose et lait:

a) Forme trace d'acide volatil. Cellules le plus souvent accouplées par deux. Largeur: 1,15  $\mu$ : *Lactobacterium conglomeratum*;

b) Pas d'acide volatil. Chaînettes courtes et jusqu'à 14  $\mu$ . Largeur: 0,8  $\mu$  en moût gélosé: *Lactobacterium floccogenum*.

B. Producteurs de CO<sub>2</sub> (produisant à côté de l'acide lactique de l'acide succinique, acide acétique, acide formique, alcool, etc.).

1<sup>o</sup> Dégagement lent de CO<sub>2</sub>. Acidité totale correspondant à environ 10 cm<sup>3</sup> d'alcali normal par 100 cm<sup>3</sup> de culture. Acidifie bien lactose et lait. Longueur: 1—2,6  $\mu$ : *Lactobacterium paucifermens*.

2<sup>o</sup> Dégagement intense de CO<sub>2</sub>. Acidité totale correspondant à environ 20 cm<sup>3</sup> d'alcali normal par 100 cm<sup>3</sup> de culture. Acidifient peu lactose et lait:

<sup>9)</sup> Arch. néerl. des Sc. ex. et natur., p. 357 (1907).

<sup>10)</sup> Annuaire agricole de la Suisse, 32, p. 624 (1918).

<sup>11)</sup> Ann. Inst. Past., 34, p. 803 (1920).

- a) Longueur: 1,3—4,9  $\mu$  (sur moût gélosé): *Lactobacterium multivolutigenum*;  
 b) Longueur: 0,65—1,3  $\mu$  (sur moût gélosé): *Lactobacterium multivolutum*.

Dans ce groupe se rangent en outre: *B. beijerincki*, *B. maerkeri*, *B. hayducti*, *B. cucumeris fermentati*, *B. leichmanni* I, II et III (tous de Henneberg).

II<sup>0</sup> Groupe des *Lactobacterium non floconneux* ou «de la tourne» (clarification lente du moût de bière).

A. Non producteurs de CO<sub>2</sub> (= microbes lactiques vrais).

1<sup>0</sup> Ne ferment pas d'acide volatil:

- a) Dimensions: 3—30  $\mu$  : 0,87  $\mu$  sur moût gélosé: *Lactobacterium delbrücki* (= *B. delbrücki* Leichmann);  
 b) Dimensions: 1,3  $\mu$  : (*Streptococcus terricola*).

2<sup>0</sup> Forme trace d'acide volatil: (*Pediococcus acidi lactici* Lindner).

B. Producteurs de CO<sub>2</sub>.

1<sup>0</sup> Cellules relativement courtes:

- a) Clarification après 8 jours. Dimensions 1,3—4,3 : 0,87  $\mu$  : *Lactobacterium oligoacidificans*;  
 b) Clarification après 48—70 heures. Dimensions 1,6—2 : 1,15  $\mu$  : *Lactobacterium grave*;  
 c) Clarification après 20 jours. Dimensions 1,3—2 : 1—1,3  $\mu$  : *Lactobacterium listeri* (= *B. listeri* Henneberg).

2<sup>0</sup> Cellules de longueur moyenne. Dimensions 1,65—12,5 : 0,66  $\mu$  : *Lactobacterium viscogenum*.

3<sup>0</sup> Cellules pouvant devenir très longues:

- a) Température maximum d'acidification 48—49<sup>0</sup>. Dimensions 3—33 : 0,87  $\mu$  : *Lactobacterium fermentum* (= *Lactobacillus fermentum* Beijerinck);  
 b) Température maximum d'acidification 39<sup>0</sup>. Dimensions 2—21 : 0,9—1  $\mu$  : *Lactobacterium pastorianum* (= *Saccharobacillus pastorianus* van Laer).

Dans ce groupe se rangent en outre: le ferment mannitique de Gayon et Dubourg, *B. Wortmanni*, *B. buchneri*, *B. panis fermentati* de Henneberg (ces trois dernières espèces ont beaucoup de commun avec le *Lactobacterium fermentum* Beijerinck), *B. mannitopoeum* et *B. gracile* de Müller-Thurgau.

En nous basant sur cette classification, nous allons maintenant décrire les bactéries lactiques isolées des macérations de cerises étudiées.

### 1<sup>o</sup> Groupe des *Lactobacterium* floconneux.

Nous avons trouvé qu'un seul représentant de ce groupe. Il se range parmi les producteurs de CO<sub>2</sub>.

#### *Lactobacterium paucifermentans* var. *cerasi*.

Ce microbe a été trouvé dans une macération de cerises préparée au laboratoire, après deux mois de fermentation, ainsi que dans une macération industrielle préparée à la distillerie X. Fischlin fils S. A. à Arth (Rigi). Il se distingue du *Lactobacterium paucifermentans* décrit par *van Steenberge* surtout par ses dimensions et une clarification plus rapide du moût. C'est un organisme qui se développe bien en 24 heures dans du bouillon à glucose à une température de 37°, et se range donc dans le premier groupe du Comité américain.

*Morphologie.* Sur moût de bière gélosé, les dimensions sont d'environ 1 : 1,5—5—12  $\mu$ <sup>12)</sup>. Les cellules sont ou bien isolées, ou bien associées par deux ou en courtes chaînettes; ces dernières présentent souvent une forme brisée. Les coins sont généralement assez prononcés. Ce microbe immobile se laisse colorer d'après la méthode de Gram et ne forme pas de spores.

*Milieux liquides* Cette bactérie ne se développe pas dans le bouillon ordinaire, mais quand on ajoute à ce milieu 2% de dextrose, un dépôt floconneux s'est déjà formé après 24 heures et le deuxième jour on constate en outre un trouble faible du milieu. Le troisième jour, on ne constate encore aucune formation d'anneau. La culture en moût de bière non houblonné d'une concentration de 10<sup>o</sup> Balling a été faite dans des éprouvettes, fermées hermétiquement, à la température de 32°. La clarification était déjà complète après 24 heures et il s'était formé un précipité assez fort qui se laissait facilement suspendre dans le liquide. Pendant la durée d'observation de 2 mois aucun anneau et aucune pellicule ne se sont formés.

*Culture en plaque.* En nous servant du bouillon gélosé, nous avons obtenu après 2 jours à la température de 37° aucune colonie à la surface, tandis que dans la profondeur de larges colonies d'un diamètre de 5—8 mm s'étaient étalées. Par contre, sur le moût de bière gélosé se développent après 5 jours les petites colonies typiques des bactéries lactiques, de couleur grise et ayant un aspect humide; ces colonies rondes sont assez élevées et ont un bord très peu irrégulier.

*Culture en strie.* La strie sur bouillon gélosé présente après 3 jours à 37° un aspect voileux; elle est mince, peu brillante, de couleur grisâtre, et possède des bords uniformes. Sur du moût de bière gélosé,

<sup>12)</sup> Le chiffre en italique indiquera toujours la plus haute fréquence (voir: Schweizer, Ann. Inst. Past., 35, p. 824 (1921).



on constate également une strie assez fine et de la même couleur, qui ne s'élargit que très peu avec le temps.

*Culture en piqûre.* Dans le moût de bière gélatiné, on constate après 6 jours une strie uniforme et bien développée, qui après 2 mois ne montre encore aucun embranchement. Des bulles gazeuses se sont développées dans le cylindre de gélatine. A la surface de la gélatine, la végétation montre une forme ronde, un peu élevée et à bords uniformes; elle a un aspect humide et une couleur grisâtre. La gélatine n'est pas liquéfiée.

*Culture sur pomme de terre.* Sur une tranche de pomme de terre, le *Lactobacterium paucifermentans* var. *cerasi* ne se développe d'abord que faiblement, mais après 1 mois on a une strie blanche très nette; la couleur de la pomme de terre n'a guère changé.

*Actions biochimiques.* L'acidification du moût de bière pendant 30 jours à 30° nous a donné les résultats suivants:

$$p_H = 3,5$$

$$\text{Acidité totale} = 8,9 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 1,24 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Alcool} = 0$$

Le milieu non fermenté lui-même présentait les valeurs suivantes:

$$p_H = 5,9$$

$$\text{Acidité totale} = 1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 0,03 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

Nous n'avons pu constater aucune formation de gaz dans le moût de bière, mais elle était nette dans ce même milieu solidifié par la gélose. L'acidification du moût de bière à différentes températures nous a donné les résultats que voici:

$$45^\circ: 1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$37^\circ: 3,8 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$32^\circ: 5,4 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$27^\circ: 5,0 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$20^\circ: 2,6 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

L'acidité primitive du milieu ayant été 1,3; il n'y avait donc aucune formation d'acides à 45°. Avec les différents sucres, la mannite et le lait nous avons obtenu après 30 jours à la température de 30°, les acidités suivantes:

Eau de levure à 5 %	de dextrose:	(Milieu primitif: 0,4)
» » » » »	lévulose:	7,7 ( » » : 0,5)
» » » » »	maltose:	7,2 ( » » : 0,3)
» » » » »	saccharose:	5,4 ( » » : 0,1)
» » » » »	dextrine:	1,2 ( » » : 0,7)
» » » » 3 %	mannite:	0,4 ( » » : 0,4)
Lait . . . . .		5,0 ( » » : 2,3)

Il n'y avait aucune acidification de la mannite. Le lait n'était pas encore coagulé après 4 semaines.

L'eau oxygénée n'est pas décomposée par une suspension du *Lactobacterium paucifermentans* var. *cerasi*.

## II<sup>o</sup> Groupe des *Lactobacterium* non floconneux.

Les représentants de ce groupe que nous avons isolés de macérations de cerises sont tous des producteurs de CO<sub>2</sub> et se rangent dans la sous-division des cellules relativement courtes.

### *Lactobacterium cerasi* I nov. sp.

Cette bactérie a été isolée d'une macération industrielle de 50 litres de cerises rouges préalablement stérilisée et mise en fermentation par une culture pure de *Saccharomyces Chodati* Schweizer. Elle se rapproche du *Bacterium casei*  $\varepsilon$  v. Freudenberg, mais se distingue nettement par la non coagulation du lait. Le *Lactobacterium cerasi* I appartient également au premier groupe du Comité américain, car il se développe bien en 24 heures dans du bouillon à dextrose à 37°.

*Morphologie.* Sur moût de bière gélosé, les cellules ont une largeur de 1  $\mu$  et une longueur de 3—5  $\mu$ ; elles sont isolées ou associées par deux ou en chaînettes qui peuvent avoir jusqu'à huit membres. Ces chaînettes sont généralement un peu courbées. Cet organisme est immobile, prend le Gram et ne forme pas de spores.

*Milieux liquides.* Dans le bouillon ordinaire, on observe une formation de dépôt déjà après 24 heures et un faible trouble après 3 jours. Il ne se forme ni anneau ni pellicule et après une dizaine de jours, le milieu s'est clarifié. Dans le bouillon à dextrose, le trouble se montre déjà avec le dépôt après 24 heures et devient fort après 3 jours. Le moût de bière à 10° Balling est uniformément troublé après 24 heures, avec formation d'un faible dépôt qui, après 3 jours, est devenu plus fort. La clarification commence après 10 jours et est complète après 15 jours. Le dépôt a une consistance collante. Une formation de pellicule ou d'anneau n'a pas lieu.

*Culture en plaque.* Le *Lactobacterium cerasi* I ne se développe pas sur le bouillon gélosé. Sur le moût de bière gélosé, on observe après 5 jours des petits points gris.

*Culture en strie.* Après 3 jours, on constate sur le bouillon gélosé une strie mince de constitution voileuse et à bords uniformes; elle est peu brillante et possède une couleur grisâtre. Après 10 jours, plusieurs colonies isolées en forme de petits points se sont développées. A la loupe, elles présentent un aspect grisâtre et humide; leur forme est ronde. Sur le moût gélosé la strie est également assez fine et de couleur grisâtre.

*Culture en piqûre.* La piqûre dans le moût gélatiné se présente sous forme d'un fil uniforme; elle est bien développée après deux mois et ne forme pas d'embranchements. Dans le cylindre de gélatine, on observe des bulles gazeuses; à la surface, la végétation n'est que très rudimentaire. Même après 3 mois on ne constate aucune liquéfaction de la gélatine.

*Culture sur pomme de terre.* Point de développement.

*Actions biochimiques.* Dans le même milieu que pour la bactérie précédente, nous avons obtenu par acidification pendant 30 jours à 30° les résultats suivants:

$$p_H = 3,4$$

$$\text{Acidité totale} = 14,1 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 2,7 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Alcool} = 0$$

Une formation de gaz a seulement été remarquée dans les milieux solides, comme le moût gélosé ou gélatiné.

Dans un moût de bière qui avait une acidité primitive correspondante à 1,3 cm<sup>3</sup> d'alcali normal par 100 cm<sup>3</sup> de moût, l'acidification à différentes températures se faisait comme suit:

$$45^{\circ}: 1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$37^{\circ}: 5,1 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$32^{\circ}: 5,5 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$27^{\circ}: 5,0 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$20^{\circ}: 2,6 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

Le *Lactobacterium cerasi* I ne fonctionne donc plus à 45°. Avec l'acidification des différents sucres, de la mannite et du lait pendant 30 jours à 30°, les chiffres ont été les suivants:

Eau de levure à 5 % de dextrose:	3,5 (Milieu primitif = 0,4)
» » » » » lévulose:	9,1 ( » » = 0,5)
» » » » » maltose:	5,6 ( » » = 0,3)
» » » » » saccharose:	10,6 ( » » = 0,1)
» » » » » dextrine:	1,3 ( » » = 0,7)
» » » » 3 % » mannite:	0,4 ( » » = 0,4)
Lait . . . . .	3,4 ( » » = 2,3)

La mannite n'est donc pas acidifiée. Après un mois le lait n'était pas encore coagulé.

Cette bactérie ne contient pas de catalase.



*Lactobacterium cerasi* II nov. sp.

Le *Lactobacterium cerasi* II est un représentant de la deuxième série du «Committee on the Chart for identification of Bacterial Species of the Society of American Bacteriologists»; il s'est bien développé

dans le bouillon à glucose qu'à la température de 25° et après 48 heures. Ce microbe a été isolé d'une macération de cerises de 300 litres, mise en fermentation par une culture pure de *Saccharomyces Zopfii* Artari. Il se rapproche un peu du *Lactobacterium oligoacidificans*, mais s'en distingue nettement par une forte acidification du lait et la coagulation de ce même milieu, ainsi que par la fermentation de la mannite. Cette bactérie se rapproche également du ferment mannitique de Gayon et Dubourg.

*Morphologie.* Les dimensions des cellules deviennent sur moût de bière gélosé environ 1 : 1,2—5  $\mu$ ; on constate également des formes rondes. Les cellules sont généralement associées par deux ou en chaînettes. Les coins peuvent être assez prononcés. Cette espèce est également immobile, ne forme pas de spores et prend le Gram.

*Milieux liquides.* Un faible dépôt se forme dans du bouillon ordinaire après 24 heures et le lendemain il y a formation d'un trouble faible; la clarification se fait après une dizaine de jours. Dans du bouillon à dextrose, l'aspect de la végétation est le même. Dans le moût de bière à 10° Balling, on observe après 24 heures un trouble finement floconneux et un dépôt assez fort; la clarification commence après 6 jours et est complète après 10 jours. Le *Lactobacterium cerasi* II ne forme ni anneau, ni pellicule.

*Culture en plaque.* Ce microbe n'a pas formé de colonies à la surface du bouillon gélosé. Les colonies sur moût gélosé sont rondes et un peu élevées, d'un diamètre d'environ 0,3 mm, et elles ont une couleur grisâtre et un aspect humide. Leur bord est un peu irrégulier.

*Culture en strie.* Sur bouillon gélosé, on observe après 3 jours une mince strie grisâtre de consistance voileuse, tandis que sur moût gélosé la strie est au contraire assez bien développée.

*Culture en piquère.* Dans le moût de bière gélatiné, la strie se présente sous forme d'un fil bien développé et uniformément épais. La végétation à la surface est très rudimentaire et dans la profondeur, des bulles gazeuses se sont développées. La gélatine n'est pas liquéfiée.

*Culture sur pomme de terre.* Le *Lactobacterium cerasi* II se développe bien sur tranche de pomme de terre, en y formant une strie brunâtre à bords bien nets. La pomme de terre elle-même est noircie.

*Actions biochimiques.* Dans le moût de bière ayant une acidité propre correspondante à 1,3 cm<sup>3</sup> d'alcali normal par 100 cm<sup>3</sup> de moût, la fermentation pendant 30 jours à 30° a donné les résultats que voici;

$$p_H = 3,2$$

$$\text{Acidité totale} = 16,8 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 4,22 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Alcool} = 0$$

Une formation de gaz a seulement été constatée dans le moût gélatiné.

Dans le moût de bière, l'acidification se faisait à différentes températures comme suit:

45°:	1,5 cm <sup>3</sup> n par 100 cm <sup>3</sup> de moût
37°:	5,0 cm <sup>3</sup> n par 100 cm <sup>3</sup> de moût
32°:	5,4 cm <sup>3</sup> n par 100 cm <sup>3</sup> de moût
27°:	5,6 cm <sup>3</sup> n par 100 cm <sup>3</sup> de moût
20°:	2,7 cm <sup>3</sup> n par 100 cm <sup>3</sup> de moût

Cette bactérie se distingue donc des deux précédentes par une acidification, quoi que très faible, à la température de 45°. Les différents sucres, la mannite et le lait ont été acidifiés de la manière suivante:

Eau de levure à 5% de dextrose:	10,5	(Milieu primitif = 0,4)
» » » » » » lévulose:	10,6	( » » = 0,5)
» » » » » » maltose:	7,4	( » » = 0,3)
» » » » » » saccharose:	10,5	( » » = 0,1)
» » » » » » dextrine:	1,8	( » » = 0,7)
» » » » 3% » mannite:	1,5	( » » = 0,4)
Lait . . . . .	11,6	( » » = 2,3)

Le lait est complètement coagulé après 3 semaines. Le *Lactobacterium cerasi* II se distingue des deux précédents par sa faculté d'acidifier la mannite.

La réaction à la catalase est négative.

#### *Lactobacterium grave var. cerasi.*

Cette espèce se distingue du *Lactobacterium grave* décrit par van Steenberge surtout par la température optimum et l'acidification des sucres. Il se rapproche du *Bacterium mannitopoeum* Müller-Thurgau ainsi que du *Bacterium casei*  $\vartheta$  I Burri et Staub, mais il se développe sur tranche de pomme de terre ce qui pour le *Bacterium casei*  $\vartheta$  von Freudenreich n'est pas le cas. Ce microbe a été isolé au mois de septembre d'une macération fermentée de cerises récoltées dans les environs d'Arth. Il se développe bien en 24 heures dans du bouillon à dextrose à une température de 37° et appartient donc au premier groupe du Comité américain.

*Morphologie.* Les cellules ont un diamètre de 0,75  $\mu$  et une longueur de 1—2—3  $\mu$ . Elles peuvent aussi bien être isolées qu'être associées par deux ou en chaînettes à quelques membres. Les coins sont assez prononcés. Ce microbe, comme les précédents, est immobile, ne forme pas de spores et prend le Gram.

*Milieux liquides.* Le *Lactobacterium grave var. cerasi* ne se développe pas en bouillon ordinaire. Dans ce même milieu additionné de

dextrose, un dépôt se forme après 24 heures et après 3 jours on constate un trouble faible. Dans le moût de bière, 24 heures suffisent pour qu'un fort dépôt et un trouble finement floconneux se forment. Après 3 jours, la clarification est déjà complète et le dépôt est par conséquent devenu plus fort; il ne se forme ni anneau ni peau.

*Culture en plaque.* Sur le milieu gélosé, on observe après 8 jours des colonies jaunâtres d'un diamètre de 3—4 mm; elles ont un aspect humide, un bord régulier et sont peu élevées. Sur le moût gélosé, les colonies ont une couleur grisâtre et un aspect brillant; leur diamètre est de 1,1—1,2 mm et leur bord est légèrement irrégulier.

*Culture en strie.* La strie de cette bactérie ne se développe que très lentement sur le bouillon gélosé et après une dizaine de jours on observe qu'une ligne très fine composée de petites colonies. Sur moût de bière gélosé, la strie grisâtre reste également très fine et a une consistance voileuse.

*Culture en piqûre.* La piqûre dans le moût gélatiné présente après 6 jours un aspect uniforme et bien développé; il se forment plus tard des embranchements arborescents. La formation de bulles gazeuses est très nette. A la surface de la gélatine on constate une masse bactérienne grisâtre peu étendue et d'un aspect très peu caractéristique. Même au bout de 3 mois, la gélatine n'est pas liquéfiée.

*Culture sur pomme de terre.* Cette bactérie se développe sur la tranche de pomme de terre de la même manière que le *Lactobacterium paucifermentans* var. *cerasi*, avec la seule différence qu'il y a peut-être un léger virement de la pomme de terre en noir.

*Actions biochimiques.* L'acidification par le *Lactobacterium grave* var. *cerasi* produit, dans les mêmes conditions que pour les espèces précédentes, les valeurs suivantes:

$$p_H = 3,4$$

$$\text{Acidité totale} = 9,4 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 1,29 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Alcool} = 0$$

En plongeant un fil de platine chaud dans le milieu, le dégagement de gaz n'était pas très net. On a constaté la formation de gaz que dans le moût gélatiné, mais pas dans ce même milieu gélosé.

Dans ce même moût de bière d'une acidité propre de 1,3 cm<sup>3</sup> n par 100 cm<sup>3</sup> de moût, l'acidification à différentes températures se fait comme suit:

$$45^{\circ}: 1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$37^{\circ}: 5,5 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$32^{\circ}: 5,5 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$27^{\circ}: 5,0 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$20^{\circ}: 2,6 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

A 45° ce microbe n'agit donc plus. L'acidification des différents sucres, de la mannite et du lait produit après 30 jours à 30° les résultats suivants:

Eau de levure à 5 % de dextrose:	(Milieu primitif = 0,4)
» » » » » lévulose:	5,8 ( » » = 0,5)
» » » » » maltose:	1,9 ( » » = 0,3)
» » » » » saccharose:	4,5 ( » » = 0,1)
» » » » » dextrine:	1,2 ( » » = 0,7)
» » » » 3 % mannite:	0,5 ( » » = 0,4)
Lait . . . . .	2,6 ( » » = 2,3)

L'acidification du lait et la mannite est donc extrêmement faible. Après 4 semaines, le lait n'est pas encore coagulé.

Le *Lactobacterium grave* var. *cerasi* ne décompose pas l'eau oxygénée.

*Lactobacterium listeri* var. *cerasi*.

Cette bactérie se distingue du *Lactobacterium listeri* décrit par van Steenberg (= Bac. *listeri* Henneberg) surtout par ses colonies et se rapproche du *Bacterium mannitopoeum* Müller-Thurgau en ce qui concerne la non-acidification de la lactose. Elle a été isolée d'une macération de 50 litres de cerises stériles mises en fermentation par le *Saccharomyces Fischlinii* Schweizer. Ce microbe se range avec le *Lactobacterium cerasi* II dans la deuxième série du Comité américain.

*Morphologie.* La morphologie correspond avec celle du *Lactobacterium cerasi* précédemment décrit; les formes à deux cellules ont souvent un arrangement anguleux.

*Milieux liquides.* Dans le bouillon ordinaire, ce microbe ne se distingue du *Lactobacterium cerasi* I que par la non-formation d'un trouble après 3 jours. Dans le bouillon à dextrose, il se forme après 2 jours un faible précipité et le liquide se trouble. Dans le moût de bière, le trouble se produit déjà après 24 heures et plus tard on constate également un faible précipité. La clarification ne se fait que tardivement et n'est complète qu'au bout de 2 mois. Il n'y a jamais formation d'un anneau ou d'une pellicule.

*Culture en plaque.* Les cultures en plaque donnent des résultats tout-à-fait identiques à ceux obtenus avec le *Lactobacterium cerasi* II.

*Culture en strie.* Sur le bouillon gélosé incliné, ce microbe se développe que lentement et on constate nettement une strie assez fine qu'après une dizaine de jours. Cette strie est incolore, peu brillante et possède un bord non-articulé. Sur moût de bière gélosé la strie apparaît plus vite, mais elle ne se développe pas davantage.

*Culture en piqure.* L'aspect de la culture en piqure est le même que pour le *Lactobacterium cerasi* II; il n'y a pas non plus liquéfaction de la gélatine.

*Culture sur pomme de terre.* Contrairement au *Lactobacterium cerasi* II, le *Lactobacterium listeri* var. *cerasi* ne se développe que faiblement sur la tranche de pomme de terre. La végétation possède une couleur blanche et la pomme de terre n'est pas noircie.

*Actions biochimiques.* L'acidification du moût de bière, d'une acidité propre correspondant à 1,3 cm<sup>3</sup> d'alcali normal par 100 cm<sup>3</sup> de moût, pendant 30 jours à 30°, produit les résultats suivants:

$$p_H = 3,4$$

$$\text{Acidité totale} = 8,1 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Acidité volatile} = 0,32 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ (témoin } 0,03)$$

$$\text{Alcool} = 0$$

La formation de gaz n'a pu être constatée que dans les milieux solidifiés par la gélose ou la gélatine.

Dans ce même moût de bière, l'acidification se faisait à différentes températures comme suit:

$$45^\circ: 1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$37^\circ: 4,2 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$32^\circ: 5,0 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$27^\circ: 3,5 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

$$20^\circ: 1,9 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$$

Aucune acidification n'a donc eu lieu à la température de 45°. L'acidification de différents sucres, de la mannite et du lait donne dans les mêmes conditions que pour les espèces précédentes, les valeurs suivantes:

Eau de levure à 5%	de dextrose:	2,6	(Milieu primitif = 0,4)
» » » » » »	lévulose:	4,6	( » » = 0,5)
» » » » » »	maltose:	3,0	( » » = 0,3)
» » » » » »	saccharose:	3,5	( » » = 0,1)
» » » » » »	dextrine:	1,4	( » » = 0,7)
» » » » 3%	mannite:	0,4	( » » = 0,4)
Lait . . . . .		2,5	( » » = 2,3)

Le lait n'est pas coagulé.

Avec l'eau oxygénée, nous constatons l'absence de catalase.

### Genre streptococcus.

Le travail de van Steenberghe ne s'occupant que du genre *Lactobacterium*, nous traitons ici à part le seul streptocoque lactique qu'on a trouvé dans les macérations de cerises examinées.

#### *Streptococcus cerasi* nov. spec.

En observant sous le microscope ce streptocoque, nous avons tout d'abord pensé au *Streptococcus acidilactici* Grotenfeldt, mais notre



organisme s'en distingue surtout par la non coagulation du lait et la formation d'acides volatils; il se rapproche plutôt du *Streptococcus pyogènes* Rosenbach. Ce microbe a été trouvé après 8 jours dans une macération de cerises préparée au laboratoire. Il se développe bien en 24 heures dans du bouillon à glucose à une température de 37° et se range donc dans le premier groupe du Comité américain.

*Morphologie.* Les cellules ovales et un peu irrégulières ont une largeur de 0,3—0,5  $\mu$  et une longueur de 0,4—0,5  $\mu$ . Les cellules associées par deux prédominent, mais on trouve à côté des chaînettes qui peuvent contenir jusqu'à 15 membres. Ce streptocoque, comme les *Lactobacterium* décrits, est immobile, ne forme pas des spores et se colore par la méthode de Gram.

*Milieux liquides.* Dans le bouillon ordinaire, on observe après 24 heures un dépôt et un trouble faible du liquide; après une dizaine de jours ce dernier s'est clarifié. Le développement est favorisé quand on ajoute à ce même milieu 2% de dextrose; le trouble et le dépôt sont alors plus forts. Dans le moût de bière non houblonné, un trouble uniforme se forme également après 24 heures; la clarification commence après 6 jours et est complète après 10 jours. Le dépôt est collant et visceux. Il ne se forme jamais d'anneau ou de peau.

*Culture en plaque.* En nous servant de bouillon gélosé, nous avons obtenu après 2 jours à la température de 37° que des colonies étendues dans la profondeur de la couche nutritive, qui ressemblent à celles produites par le *Lactobacterium paucifermentans* var. *cerasi*. Sur moût de bière gélosé les colonies gris-brunâtre et d'un diamètre d'environ 0,5—0,8 mm ont une forme ronde ou ovale. On y constate également des colonies en profondeur.

*Culture en strie.* Aussi bien sur le bouillon gélosé que sur le moût gélosé, on obtient après 3 jours qu'une strie mince et fine; elle est incolore sur le premier milieu et possède une couleur grisâtre sur le second.

*Culture en piqûre.* La piqûre en moût gélatiné ne se développe que très finement et incomplètement, en forme d'un fil portant des perles. Il se forme des bulles gazeuses. La végétation à la surface n'est que rudimentaire. Le *Streptococcus cerasi* ne liquéfie pas non plus la gélatine.

*Culture sur pomme de terre.* Ce streptocoque ne se développe pas sur une tranche de pomme de terre, et se distingue donc par ce fait également du streptocoque trouvé par von Freudenreich et Thöni dans le fromage suisse.

*Actions biochimiques.* Dans un moût de bière ayant primitivement une acidité totale de 1,3 et une acidité volatile de 0,03, nous avons obtenu après 30 jours à 30° les résultats suivants:

$p_H = 4,0$

Acidité totale =  $3,7 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$

Acidité volatile =  $0,32 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3$

Alcool = 0

La formation de gaz n'a pu être constatée que dans le milieu gélatiné.

L'acidification à différentes températures se faisait pendant 30 jours à  $30^\circ$  dans le même moût non solidifié comme suit:

$45^\circ$ :  $1,3 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$

$37^\circ$ :  $2,1 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$

$32^\circ$ :  $3,2 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$

$27^\circ$ :  $3,2 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$

$20^\circ$ :  $3,4 \text{ cm}^3 \text{ n par } 100 \text{ cm}^3 \text{ de moût}$

Il n'y avait donc pas non plus d'acidification à la température de  $45^\circ$ . Avec les différents sucres, la mannite et le lait nous avons obtenu, après 30 jours à la température de  $30^\circ$ , les acidités suivantes:

Eau de levure à 5 % de dextrose:	(Acidité primitive: 0,4)
» » » » » lévulose:	2,8 ( » » 0,5)
» » » » » maltose:	2,0 ( » » 0,3)
» » » » » saccharose:	2,7 ( » » 0,1)
» » » » » dextrine:	1,6 ( » » 0,7)
» » » » 3 % » mannite:	0,8 ( » » 0,4)
Lait, . . . . .	5,4 ( » » 2,3)

Notre streptocoque acidifie donc relativement faiblement les sucres et la mannite, mais un peu mieux le lait, sans provoquer la coagulation de ce dernier.

L'eau oxygénée n'est pas non plus décomposée par le *Streptococcus cerasi*.

\* \* \*

Dans les macérations de cerises nous avons donc trouvé six microbes lactiques, dont cinq appartiennent au genre *Lactobacterium* et dont le sixième est un streptocoque. Toutes ces espèces produisent à côté de l'acide lactique également des acides volatils et peuvent donc avoir une influence sur la composition des eaux-de-vie de cerises. Sauf une seule espèce, ces microbes ne produisent plus aucune acidité à  $45^\circ$ .