

à peine si les colonies sont visibles à l'œil nu; mais, à un faible grossissement, elles présentent un aspect tout à fait caractéristique. On peut ainsi prélever la semence sur une colonie isolée et la transporter soit sur le même milieu, soit dans le liquide précédemment indiqué.

Ce milieu solide s'est montré très avantageux pour l'isolement des Nitrobactéries, les autres microbes ne s'y développant que très difficilement. Cependant, les Nitrobactéries n'y forment pas de ces larges colonies comme on est habitué à en voir dans les cultures sur gélatine des Bactéries ordinaires.

Appliqué à des terres d'origine variée, le procédé a permis d'obtenir les deux sortes de ferments nitreux et nitriques, à l'état de pureté. Les ferments nitreux appartiennent, d'après Winogradsky, à deux genres: l'un propre aux terres de l'ancien monde (*G. Nitrosomonas*), l'autre à celles du nouveau monde (*G. Nitrosococcus*). Les ferments nitriques, qui accompagnent les précédents partout où la nitrification se produit, constituent un genre unique (*G. Nitrobacter*).

Mais comment, dans les milieux purement minéraux, les Nitrobactéries peuvent-elles se multiplier indéfiniment et créer leur substance organique? C'est ici que les recherches précédentes ont révélé ce fait imprévu, à savoir que ces êtres peuvent assimiler le carbone de l'acide carbonique, tout en étant dépourvus de tout pigment chlorophyllien ou autre, et cela en l'absence de la lumière. Dès ses premières expériences sur les ferments nitreux, Winogradsky a été amené à penser que la substance organique de ces microbes se forme aux dépens du carbone des carbonates. Cette synthèse se distingue de l'action chlorophyllienne en ce qu'il n'y a pas de dégagement corrélatif d'oxygène.

Plus récemment, tout en confirmant le résultat essentiel obtenu par ce savant, à savoir que les nitrosomonades transforment l'ammoniaque en acide nitreux, mais ne peuvent la changer en acide nitrique, Godlewski a montré que la nitrification s'arrête dans une solution d'un sel ammoniacal ensemencé avec ces Bactéries, lorsqu'on ne laisse arriver que de l'air débarrassé de son acide carbonique et de tout composé organique volatil, et cela malgré le carbonate de chaux ou de magnésie qu'on est obligé d'ajouter au liquide de culture, à la fois pour neutraliser ce liquide et pour fournir au microbe un aliment. Il en a conclu que les carbonates ne peuvent servir comme source de carbone aux nitrosomonades, lesquelles, au contraire, puisent leur carbone dans l'acide carbonique libre. Il ajoute aussi qu'une partie seulement de l'ammoniaque disparue se retrouve dans l'acide nitreux; l'autre partie fournit de l'azote libre, qui s'échappe de la solution, et dont la proportion varie suivant les conditions de la culture.

Duclaux se demande si l'acide carbonique de l'air ne serait pas simplement nécessaire pour amorcer la nitrification et si, à partir du moment où le carbonate a commencé à fournir de l'acide carbonique, celui-ci ne serait pas décomposé par le microbe. On ne conçoit guère pourquoi, en effet, cet acide du carbonate, dissous dans le liquide de culture, ne pourrait pas servir d'aliment au même titre que l'acide carbonique de l'air. Peut-être aussi l'acide carbonique de l'air, ayant subi l'action prolongée des rayons solaires, serait-il plus instable ou plus facile à décomposer que celui des carbonates?

Quoi qu'il en soit à cet égard, il n'en reste pas moins établi que l'acide carbonique est l'unique source de carbone pour les organismes en question.

En est-il de même pour les ferments nitriques? La réponse à cette question, dit Winogradsky, est d'autant plus difficile que les phénomènes de synthèse de

la substance organique sont plus faibles chez les ferments nitriques que chez les ferments nitreux. Toutefois, malgré l'absence d'une démonstration rigoureuse, on sera porté à admettre, par analogie, que leur nutrition carbonée ne diffère pas essentiellement de celle des ferments nitreux, surtout en songeant que les substances organiques n'exercent, chez les uns comme chez les autres, aucune influence favorable sur leur action et leur multiplication.

Il y a, chez les ferments nitriques, une grande disproportion entre l'action assimilatrice et l'action oxydante. Le rapport entre le carbone assimilé et l'azote oxydé est sensiblement constant (1 : 55); la proportion relativement très élevée de l'azote n'a rien de surprenant, si l'on remarque que la seule source d'énergie pour ces organismes est l'oxydation. Leur pouvoir ferment est donc très considérable. Mais, si l'on envisage au contraire la faible énergie du processus vital, on leur assignera le dernier rang dans l'échelle des êtres vivants.

En considérant cette puissance d'oxydation, remarquable surtout dans la terre de Quito, on s'étonne moins de l'abondance de ces énormes dépôts de salpêtre du Pérou et du Chili, formés dans des conditions dont nous ne savons rien aujourd'hui, et qui paraissent résulter d'une nitrification gigantesque remontant aux époques les plus reculées.

6° BACTÉRIES FIXATRICES D'AZOTE

Jusqu'à une date récente, le rôle de l'azote atmosphérique dans la végétation était considéré comme nul. Et pourtant, l'expérience seule, en dehors de toute idée spéculative, permet d'établir que l'intervention de l'azote libre dans la végétation est d'une nécessité absolue. Il suffit pour cela de faire la balance entre les causes de perte et les causes de gain de la terre en combinaisons azotées. Les observations de la pratique agricole montrent, en effet, que la somme des matières azotées disponibles dans la nature ne saurait suffire aux exigences de la végétation. Il est donc nécessaire que l'azote gazeux intervienne directement pour une part, et cette part, comme on sait, est très importante pour les Légumineuses.

C'est ce que M. G. Ville a soutenu dès 1849, après avoir cultivé diverses plantes sur un milieu dont la teneur en azote était connue. Mais les résultats étaient variables dans des conditions en apparence identiques, et des irrégularités, inexplicables à cette époque, se manifestaient dans la culture des Légumineuses.

On sait aujourd'hui que l'irrégularité des résultats fournis par les Légumineuses dans les conditions qui précèdent est en rapport avec la présence ou l'absence de nodosités spéciales sur leurs racines. G. Ville n'en pouvait soupçonner la cause; il n'était pas maître de ses expériences. D'autres observateurs, pour la même raison, n'obtinrent que des résultats négatifs, et Boussingault, après une discussion restée célèbre, posa en principe que les végétaux, à quelque espèce qu'ils appartiennent, sont incapables de prendre à l'air la moindre quantité d'azote. La question ne devait entrer dans une phase nouvelle que beaucoup plus tard.

Berthelot, le premier, en 1885, annonça l'intervention des micro-organismes dans la fixation de l'azote libre par le sol. Peu de temps après, il constata que le phénomène est exalté par la culture des Légumineuses. Le sol s'enrichit en

même temps que la plante, mais à un degré moindre; la répartition de l'azote dans la plante indique que c'est par les racines qu'il pénètre. Berthelot est ainsi amené à penser que, pour les Légumineuses, il doit exister quelque micro-organisme qui favorise la fixation de l'azote par les racines.

Toutefois, cette notion ne pouvait être définitivement établie que si l'existence d'un tel organisme était elle-même démontrée expérimentalement.

Cette démonstration découle pleinement des remarquables travaux publiés en 1888 par Hellriegel et Wilfarth, travaux dont l'origine remonte aux observations faites antérieurement par le premier de ces auteurs sur la nutrition végétale. Ils mettent en évidence le rôle capital, chez les Légumineuses, des tubercules ou nodosités que l'on avait remarqués depuis longtemps sur les racines de ces plantes, sans en soupçonner l'importance biologique.

Lorsqu'on examine les racines d'une Légumineuse venue en pleine terre, on y remarque toujours, disposés irrégulièrement, des renflements tuberculeux, considérés jadis comme des productions accidentelles et malades. A l'état adulte, un tubercule présente deux sortes de cellules : les unes, occupant la région centrale, sont grandes et pleines d'un contenu granuleux; les autres, constituant la région corticale, sont petites et hyalines. C'est dans la région centrale, relativement très développée, que se trouve le micro-organisme qui détermine leur formation.

Dans une même cellule, on observe deux sortes de corps : d'une part, des éléments bactériiformes en très grand nombre, que Brunchorst a désignés sous le nom de « bactéroïdes »; d'autre part, des filaments muqueux ou traînées protoplasmiques analogues à des hyphes de Champignons, qui traversent les cellules et tantôt s'élargissent en vésicules, tantôt s'atténuent en fil aigu, tantôt s'appliquent contre la paroi cellulaire, tantôt enfin s'avancent dans la cavité cellulaire sous forme de protubérances variées. Les bactéroïdes se trouvent surtout dans les cellules âgées, les filaments dans les cellules jeunes.

Malgré les différences morphologiques qu'ils présentent souvent dans les nodosités ou dans les cultures, les bactéroïdes appartiennent vraisemblablement au même type spécifique. D'une part, en effet, on peut obtenir des formes diverses avec un même tubercule, d'autre part, les formes sont souvent les mêmes dans des cultures obtenues avec des tubercules de provenance différente. C'est pourquoi Beyerinck rapporte tous les micro-organismes des nodosités à une seule espèce, le *Bacillus radicicola*.

D'autres auteurs, considérant leur mode de développement et leurs caractères particuliers, ainsi que les filaments muqueux qui les accompagnent dans les cellules des tubercules les rangent dans les Champignons. Mais il nous paraît superflu d'entrer ici dans cette discussion : leur rôle seul nous intéresse.

Les bactéroïdes formés dans les nodosités n'ont d'ordinaire qu'une assez courte durée. A un moment donné, ils remplissent toutes les cellules et périssent, laissant les tubercules bourrés de leurs cadavres. C'est pourquoi les tubercules pris sur une espèce annuelle, telle que le Pois ou la Fève, au moment de la floraison ou de la fructification, ne donnent souvent, quand on s'en sert pour inoculation, que des résultats négatifs.

Avant la fructification, la majeure partie de l'azote est localisée dans ces organes. Bréal y a dosé jusqu'à 7 parties d'azote pour 100 parties de matière sèche, tandis que le chevelu de la racine n'en contient pas plus de 2,5. La

majeure partie de l'azote s'y trouve sous forme de matières albuminoïdes, et une petite quantité à l'état d'asparagine et de corps amidés.

Une fois morts, les bactéroïdes sont vraisemblablement digérés par une diastase, qui les transforme en combinaisons solubles que la plante hospitalière utilise ou qui serviront à l'enrichissement du sol. Après cette digestion, beaucoup de tubercules présentent une cavité centrale; le plus souvent, ils deviennent la proie des microbes vulgaires et entrent en putréfaction. Le mode de conservation du microbe spécifique n'est pas encore connu d'une façon suffisamment précise; il est possible qu'il ait lieu par des spores formées dans les bactéroïdes, bien qu'on n'en ait pas constaté la formation avec certitude, ou par des kystes qui résisteraient à la putréfaction et finiraient par se mélanger à la terre qui les entoure.

Avant ces recherches sur la nature et les caractères du microbe des tubercules, Hellriegel et Wilfarth avaient pu démontrer, d'une façon certaine, les relations qui existent entre ces organes et la fixation de l'azote atmosphérique.

Les résultats de ces savants ont été confirmés par de nombreux observateurs. On a constaté ainsi que l'addition au sol des germes des tubercules permet de reproduire à coup sûr l'expérience jadis si capricieuse de G. Ville. C'était la dissémination inégale des germes spécifiques qui déterminait l'irrégularité des résultats, et si Boussingault n'avait pas réussi à voir prospérer ses cultures, c'est qu'il les plaçait dans des conditions telles qu'elles ne pouvaient acquiescer une vitalité suffisante pour tirer bénéfice de leur association avec les bactéroïdes.

On remarque, en effet, au début de la végétation, dans les sols privés d'azote, mais ensemencés avec le microbe des tubercules, un temps d'arrêt qui coïncide avec la formation des tubercules sur les racines. A ce moment, le microbe envahisseur se comporte en parasite et emprunte sa nourriture au végétal; la plante, ayant épuisé les réserves de sa graine et devant subvenir aux besoins de son hôte, souffre et paraît en état d'inanition : c'est la « faim d'azote ». Si elle n'a pas la force de résister à l'invasion, elle périt; si, au contraire, elle peut lutter, elle force le microbe à prendre son azote à l'atmosphère et elle enlève ensuite aux tubercules leur matière azotée. Par contre, le microbe tire de la plante les substances hydrocarbonées qu'il consomme pour remplir son rôle de fixateur d'azote, et cette consommation, comme on le verra plus loin, est relativement très forte.

Les intéressantes recherches préliminaires que Mazé vient de publier montrent que la propriété de fixer l'azote gazeux appartient en propre au microbe, indépendamment de l'influence exercée par la plante.

Pour se rapprocher autant que possible des conditions normales du développement de la Bactérie, Mazé prépare ses milieux de culture avec une infusion de haricots, qu'il additionne de 2 pour 100 de saccharose, 1 pour 100 de chlorure de sodium, et de traces de bicarbonate de soude. Le liquide peut être solidifié avec la gélatine.

Sur milieu solide, étalé en couche mince pour faciliter l'accès de l'air, le microbe donne à la surface une couche muqueuse, d'apparence glacée caractéristique, dont le développement est achevé dans une quinzaine de jours. En milieu liquide, il se fait une gélatinisation complète de toute la masse après le même laps de temps. Dans les deux cas, tout le sucre est consommé.

L'analyse montre que le microbe, dans l'air débarrassé de toute trace d'azote combiné, fixe l'azote libre : dans la première culture, le rapport de l'azote gagné à l'azote initial est voisin de deux tiers (0,60); dans la seconde, il atteint 1,04. Le rapport de l'azote gagné au sucre initial fourni au microbe est environ de 1 pour 100. Par suite, si les mêmes conditions étaient réalisées dans la plante, celle-ci devrait fournir au Bacille un poids d'hydrate de carbone 100 fois plus grand que le poids de l'azote qui fait partie de ses tissus à la fin de son développement.

En dehors du cas spécial des Légumineuses, Berthelot a démontré en 1885, comme on l'a vu, la présence dans le sol de micro-organismes fixateurs d'azote. Ses recherches ultérieures l'ont conduit à admettre que ces êtres doivent appartenir à des espèces fort diverses. Leur nutrition exige certains principes hydrocarbonés pour permettre la fixation de l'azote. Il paraît même nécessaire que ces substances nutritives renferment déjà quelque peu de principes azotés, pour donner aux êtres inférieurs le minimum de vitalité indispensable à l'absorption de l'azote libre. Lorsque ces principes sont trop abondants, le microbe vivra de préférence à leurs dépens; l'expérience prouve qu'il est plus florissant dans les milieux riches en azote combiné que dans les milieux pauvres, où il doit exécuter un travail spécial pour fixer l'azote de l'air.

Cependant, avant 1895, on n'avait encore isolé, à part le microbe des tubercules des Légumineuses, aucune espèce déterminée parmi les micro-organismes fixateurs d'azote. Winogradsky s'est efforcé d'y parvenir et il a réussi à isoler un bacille anaérobie, semblable aux ferments butyriques, qu'il désigne sous le nom de *Clostridium Pasteurianum*. Ce bacille fixateur d'azote a été obtenu avec toutes les terres essayées. La proportion de sucre qu'il consomme, comparée à celle de l'azote fixé, est considérable; il se comporte donc comme le microbe des tubercules de Légumineuses.

Quel est le mécanisme de la fixation de l'azote libre par cet anaérobie? Il est vraisemblable qu'il consiste dans la rencontre de l'azote avec l'hydrogène naissant au sein du protoplasme vivant, et Winogradsky suppose que la synthèse de l'ammoniaque pourrait en être le résultat immédiat.

D'autres microbes possèdent-ils aussi la propriété de fixer l'azote gazeux? C'est fort probable. Dans ces dernières années, on a constaté également que l'association de certaines Algues inférieures avec les Bactéries permet la fixation de l'azote atmosphérique. Dans ce cas, c'est l'Algue qui fournit au microbe la substance hydrocarbonée dont il a besoin pour se nourrir et dont la destruction est la source d'énergie nécessaire à la fixation de l'azote libre.

Le rôle de l'azote atmosphérique dans la végétation est donc établi maintenant d'une façon positive. Cet élément, considéré pendant si longtemps comme inerte, peut entrer en combinaison sous l'influence de certains micro-organismes; il y a des fixateurs d'azote, comme il y a des fixateurs de carbone; le rôle de ces deux sortes d'agents est complémentaire.

CHAPITRE IV

LE POLYMORPHISME ET L'ESPÈCE EN BACTÉRIOLOGIE

SOMMAIRE : 1° Ce qu'il faut entendre par polymorphisme et par constance de forme. — Influence du milieu. — 2° Opinions de Cohn, Nægeli, Zopf, etc. — 3° Recherches de Winogradsky. — 4° Polymorphisme expérimental et polymorphisme normal; leurs limites. — 5° Variations physiologiques : formation des races. — 6° Le transformisme reste encore à démontrer.

1° CE QU'IL FAUT ENTENDRE PAR POLYMORPHISME ET PAR CONSTANCE DE FORME — INFLUENCE DU MILIEU SUR LA MORPHOLOGIE

La distinction de l'espèce, en histoire naturelle, est d'autant moins facile que les organismes sont plus simples. Les êtres supérieurs présentent, au cours de leur évolution, une succession de formes qui servent de caractères spécifiques, et, souvent, il suffit d'en considérer un petit nombre, parfois même une seule, pour arriver à la détermination. Mais ces formes correspondent à des organes, ou tout au moins à des degrés de différenciation qui s'effacent peu à peu chez les Bactéries; ici, les diversités d'aspect se fondent en une apparence monotone et de moins en moins différenciée, pour se réduire à des variations dans la forme d'une cellule, et, alors même qu'on a suivi le développement tout entier, la simplicité des formes bactériennes rend souvent incertaine la détermination spécifique.

A la difficulté qui provient de la ressemblance extérieure offerte par des espèces différentes, vient encore s'ajouter la variation fréquente des caractères morphologiques sous l'influence des milieux; de sorte qu'aucun caractère, pris isolément, ne peut servir de base à une distinction rigoureuse. Il faut donc s'adresser en même temps aux propriétés biologiques, sans oublier qu'elles-mêmes manquent de stabilité. Les agents virulents, par exemple, s'atténuent par l'action de la chaleur, de l'air, de la lumière, du milieu nutritif, etc., et, sans changer de caractères morphologiques, un même microbe peut ne plus jouir des mêmes propriétés.

Ces variations morphologiques et physiologiques ont été, en partie, la cause de la négation de l'espèce chez les Bactéries. Toutefois, on n'a pas tardé à faire justice des théories d'après lesquelles quelques espèces seulement, ou même une seule espèce, pourraient revêtir, en des métamorphoses successives, les aspects les plus imprévus et les fonctions les plus diverses. La Mycologie, elle aussi, a passé par une phase où florissaient de semblables idées, que le polymorphisme normal de divers Champignons avait contribué à faire surgir. Les organismes plus élevés, qui se prêtent mieux au contrôle et sont plus faciles à suivre, ne montrent aucun exemple de ce transformisme à outrance. Il en est de même chez les Bactéries, et la fixité relative de l'espèce reste une loi générale.

Assurément, la forme extérieure peut varier chez ces organismes comme elle varie chez les autres végétaux; mais cette variabilité ne comporte pas une inter-