

Sur la production de l'ammoniaque dans le sol par les microbes; par Émile Marchal, ingénieur agricole, à Bruxelles.

1. Les recherches de ces dernières années ont montré la part immense qui revient aux microbes dans la nutrition des plantes.

Les expériences de Duclaux (*), de Laurent (**), ont fait voir qu'en milieu stérilisé les végétaux supérieurs tirent très difficilement parti des matières organiques qui proviennent des débris végétaux et animaux et constituent l'humus.

Grâce aux microbes, ces substances sont dans le sol peu à peu minéralisées, transformées en composés simples, minéraux, facilement assimilables pour les plantes.

Cette minéralisation porte à la fois sur les trois groupes de substances auxquels on peut rapporter l'immense variété des productions organiques en tant qu'elles jouent un rôle physiologique important : les hydrates de carbone, les matières grasses et les substances azotées.

Les hydrates de carbone sont rapidement oxydés par les moisissures, les levûres et les bactéries du sol, en acide

(*) DUCLAUX, *Sur la germination en sol riche en matière organique mais exempt de microbes*. Comptes rendus, t. C, p. 68.

(**) LAURENT, *Les microbes du sol. Recherches expérimentales sur leur utilité pour la croissance des végétaux supérieurs*. Bulletin de l'Académie royale de Belgique, 1886, t. XI, p. 428.

carbonique et en eau. Le processus d'oxydation des matières grasses est resté jusqu'ici plus obscur; d'après Duclaux, elles seraient tout d'abord saponifiées par voie purement chimique et les produits de cette saponification (glycérine, savons) seraient alors comburés par les microbes.

2. Quant aux substances azotées qui, au point de vue agricole, nous intéressent surtout, le retour de leur azote à l'état minéral constitue le phénomène auquel, dans son ensemble, Schloesing et Muntz (*) ont donné le nom de *nitrification*.

Les travaux récents de P. Frankland (**), de Warington (***) et surtout les belles et minutieuses études de Winogradsky (iv), ont précisé d'une façon remarquable nos connaissances à ce sujet, et nous savons aujourd'hui que la transformation de l'azote organique en nitrates constitue un phénomène complexe et s'accomplit en plusieurs phases auxquelles président des agents particuliers :

1° La transformation de l'azote organique en ammoniacque ou *ammonisation*, comme on pourrait l'appeler.

2° L'oxydation de l'ammoniacque en acide nitreux.

(*) SCHLOESING et MUNTZ, *Recherches sur la nitrification*. Comptes rendus, t. LXXX et suiv.

(**) P. FRANKLAND, *Ueber einige typische Microorganismen im Wasser und im Boden*. Zeitschrift f. Hygiene, t. VI, p. 375.

(***) WARINGTON, *Journal of the chemical Society*, 1879 et années suiv.

(iv) WINOGRADSKY, *Recherches sur les organismes de la nitrification*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1890 et 1891.

D'après Winogradsky, elle se produit sous l'influence d'organismes incapables de s'attaquer à la matière organique dont ils redoutent même la présence.

Enfin 3° la transformation de l'acide nitreux en acide nitrique, terme final de ce processus de minéralisation.

Comme le fait M. le professeur Errera dans son cours, on peut désigner ces deux derniers phénomènes respectivement sous les noms de *nitrosation* et de *nitration*.

C'est à l'étude des organismes de l'ammonisation qu'est consacré le présent travail.

Il est nécessaire de distinguer dès maintenant la production d'ammoniacque aux dépens de la matière organique de celle qui résulte de l'hydratation de l'urée (fermentation ammoniacale de l'urée) ou de la réduction des nitrates (dénitrification) sous l'influence des microbes étudiés pour la première fois par Gayon et Dupetit.

3. L'ammonisation est donc le phénomène primaire à la faveur duquel l'azote des substances organiques retourne progressivement à l'état minéral. Les ferments ammoniacaux préparent le terrain aux ferments nitreux et nitriques.

De plus, dans certaines conditions où, par suite de l'acidité du milieu, la production de nitrates est rendue impossible (dans l'humus des forêts, le sol des landes, etc.), la minéralisation de l'azote organique s'arrête au stade ammoniacque.

Les produits de l'activité des microbes ammonisants peuvent servir directement comme source d'azote à la nutrition des plantes, les recherches de Muntz (*), de

(*) MUNTZ, *Sur le rôle de l'ammoniacque dans la nutrition des végétaux*. Comptes rendus, t. CIX, p. 646.

Laurent (*), de Griffiths (**), ayant montré que, même en sol stérilisé, les sels ammoniacaux sont assimilables par les végétaux.

On a souvent, mais à tort, ramené la production d'ammoniaque dans le sol à la seule hydratation de l'urée. Mais, comme l'a dit Duclaux (***), toutes les fermentations ammoniacales du sol ne sont pas des fermentations de l'urée; on peut même ajouter que, dans les conditions de culture habituelles, l'urée des déjections animales arrive au sol complètement hydratée, cette décomposition commençant déjà à l'étable pour s'achever dans le tas de fumier ou la citerne à purin.

Le *Micrococcus ureae* ou, d'une manière plus générale, les *urobactéries* de Miquel (iv) sont donc loin de constituer les agents essentiels de la production de l'ammoniaque dans le sol.

4. Une première question se pose ici. La production d'ammoniaque, dans la terre arable, doit-elle être exclusivement attribuée à des microbes? Ne peut-elle s'accomplir sous l'influence de facteurs purement chimiques?

Des expériences récentes de Muntz et Coudon (v) ont

(*) LAURENT, *Recherches sur la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliments de la levure de bière et de quelques autres végétaux*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1889, p. 362.

(**) GRIFFITHS, *Chemical News*, t. LXIV, p. 147; 1894.

(***) DUCLAUX, *Les microbes du sol*. *Revue critique*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1887, p. 246.

(iv) MIQUEL, *Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée*. Annales de Micrographie, 1890, 1891, 1892.

(v) MUNTZ et COUDON, *La fermentation ammoniacale de la terre*. Comptes rendus, février 1893.

démontré qu'un sol stérilisé, enrichi à l'aide de sang desséché, par exemple, ne présente aucune formation d'ammoniaque, tandis que la même terre, pourvue de microbes, en produit abondamment.

Des essais similaires m'ont conduit aux mêmes résultats.

Voici les conditions expérimentales dans lesquelles je me suis placé.

Dans deux ballons contenant 250 grammes d'une terre ne renfermant que des traces d'ammoniaque, il était ajouté 25 centimètres cubes de la solution albumineuse incoagulable dont il sera parlé plus loin. Les récipients de culture ainsi préparés étaient stérilisés à l'autoclave, pendant une heure, à 115°. Après refroidissement, l'un d'eux étaitensemencé avec quelques gouttes du liquide trouble obtenu en délayant un peu de terre de jardin dans de l'eau stérilisée, l'autre ne recevait aucun germe.

Après vingt jours de séjour dans la chambre thermostatique chauffée à 30°, j'ai dosé l'ammoniaque par distillation sur la magnésie dans l'extrait chlorhydrique des deux terres.

Les chiffres suivants furent obtenus :

1. Ballon stérile traces d'ammoniaque.
2. Ballon avec microbes du sol. 34^{mg}.2.

La nécessité de l'action des microbes apparaît nettement ici.

5. Quelles sont, parmi les nombreuses espèces microbiennes qui peuplent les couches superficielles du sol, celles qui interviennent d'une façon prépondérante dans l'ammonisation? Sont-ce des moisissures, des formes bourgeonnantes ou des bactéries?

Il s'agissait pour résoudre ces questions :

1° D'isoler du sol les espèces microbiennes (moisissures, formes-levûres, bactéries) qui y sont les plus fréquentes ;

2° De rechercher celles d'entre elles qui sont susceptibles de transformer les substances azotées en ammoniacque.

Pour l'isolation des microbes du sol, j'ai eu recours à la méthode de séparation de Koch sur gélatine, en cristallisoirs de Petri.

De chaque échantillon de terre, il était fait au moins deux cultures, l'une en gélatine alcaline avec bouillon et peptone, l'autre en gélatine et jus de pruneaux légèrement acide, pour la recherche des moisissures et des levures.

Ces essais ont porté sur les terres les plus diverses : terres arables, fumées ou non fumées, sablonneuses, humeuses ou calcaires, terres de landes, de forêts, ainsi que sur différents terreaux, composts, fumiers et purins provenant des environs de Bruxelles.

Ces très nombreuses cultures sur plaque m'ont fourni plus de trente espèces bactériennes et une vingtaine de moisissures et de formes-levures.

Au nombre des bactéries les plus fréquentes dans la terre arable, je citerai : *Bacillus mycoïdes* Flügge, *fluorescens liquefaciens* Flügge, *fluorescens putidus* Flügge, *janthinus* Zopf, *mesentericus vulgatus* Flügge, *mesentericus ruber* Globig, *termo* Dujardin, *Proteus vulgaris* Häuser, une Sarcine très analogue à la *Sarcina lutea* Schröter, et quelques *Micrococcus* : *Micrococcus roseus* Schröter, *luteus* Schröter, *flavus* Flügge, *candicans* Flügge.

Moins constantes sont les formes suivantes : *Bacillus arborescens* Frankland ; un Bacille à colonies formées de

filaments droits ou élégamment spiralés que je rapporte au *Bac. figurans* décrit par Crookshank (*), le *Bac. subtilis*, moins fréquent qu'on pourrait le supposer dans le sol, un Bacille court, analogue au *Micrococcus prodigiosus*, produisant à 30° dans les solutions albumineuses une matière colorante rouge d'une rare intensité ; une forme du *Bac. coli communis*, *Bac. brunneus* Schröter, *cremôides* Zimmermann ; quelques *Micrococcus* parmi lesquels le *Micrococcus ureae* Van Tieghem ; enfin, un assez grand nombre de formes que je ne suis pas parvenu jusqu'ici à identifier avec des types décrits, et que je ferai connaître dans un mémoire ultérieur.

Au nombre des moisissures, se trouvaient notamment : *Penicillium glaucum*, *cladosporioïdes*, *Mucor Mucedo*, *racemosus*, *Botrytis cinerea*, *vulgaris*, divers *Stemphylium*, *Cladosporium* et états polymorphes, *Alternaria tenuis*, des *Aspergillus*, dont une espèce nouvelle intéressante que j'ai appelée *Aspergillus terricola* (**); nombre de formes bourgeonnantes, formes *Torula*, *Monilia*, etc., le *Streptothrix Foersteri*.

6. Ces espèces microbiennes étant isolées, il s'agissait de déterminer celles qui prennent part à la fermentation ammoniacale. Dans ce but, j'ai pris comme point de départ l'albumine de l'œuf. Les matières albuminoïdes constituent, en effet, de tous les matériaux azotés du sol, ceux qui s'y trouvent en plus grande quantité, qu'ils

(*) CROOKSHANK, *Manuel pratique de bactériologie*, p. 199.

(**) MARCHAL, *Sur une espèce nouvelle du genre Aspergillus*. *Revue mycologique*, 1893, n° 3.

proviennent de débris végétaux ou animaux, d'engrais divers, sang desséché, déchets de laine, etc.

Je pensais, d'autre part, que les microbes susceptibles de transformer l'albumine en ammoniaque pourraient *a fortiori* oxyder les autres substances azotées, amines, amides, acides amidés, qui constituent déjà une étape plus avancée dans la voie de la minéralisation. Comme on le verra plus loin, cette hypothèse s'est en grande partie vérifiée.

J'ai donc fait usage de solutions de blanc d'œuf à 10 ‰, renfermant environ 2 grammes par litre d'azote albuminoïde.

Il était désirable, pour se rapprocher des conditions naturelles, d'employer des solutions albumineuses diluées, la matière organique azotée ne se trouvant dans le *sol arable* qu'en quantités relativement faibles (0^{gr},2 à 3 grammes d'azote organique par kilogramme de terre).

Ces liquides ont été stérilisés par le procédé que j'ai décrit précédemment (*) et qui consiste à ajouter, par litre de bouillon albumineux, 10 centimètres cubes d'une solution au $\frac{1}{4000}$ de sulfate ferreux.

La présence de ce sel entravant la coagulation de l'albumine, on peut sans inconvénient stériliser à haute température.

Les liquides ainsi obtenus ne présentent pas trace d'ammoniaque; le réactif de Nessler n'y donne lieu à aucune coloration.

Les bactéries du sol, à l'état de cultures absolument

(*) MARCHAL, *Bulletin de l'Académie royale de Belgique*, t. XXIV, p. 525, 1892.

pures, ont été ensemencées dans des ballons Pasteur renfermant une dizaine de centimètres cubes de solution albumineuse.

Ces cultures ont été placées à la chambre thermostatique à 30° pendant 15 jours.

Après ce temps, on a recherché si les liquides de culture renfermaient de l'ammoniaque.

Dans une partie de la liqueur, on essayait la réaction de Nessler; une autre portion était chauffée avec de la magnésie calcinée et l'on recherchait l'alcali volatil dans les vapeurs par le papier de tournesol.

Ces deux essais se sont toujours montrés concordants dans leurs résultats.

La simple coloration en jaune du liquide, ou la formation d'un précipité par le réactif de Nessler, indiquait si la quantité d'ammoniaque produite était insignifiante ou notable.

Les espèces suivantes m'ont présenté une réaction ammoniacale très intense :

Bacillus arborescens.

- *coli communis* var.
- *figurans.*
- *fluorescens putidus.*
- *fluorescens liquefaciens.*
- *mesentericus vulgatus.*
- *mycoïdes.*
- *subtilis.*
- *termo.*

Bacillus janthinus.

- *spec. 1.*
- *spec. 2.*
- *spec. 3.*
- *spec. 4.*
- Micrococcus albicans.*
- Proteus vulgaris.*
- Sarcina lutea.*

Chez la plupart des autres espèces, la réaction, bien que très nette, présentait beaucoup moins d'intensité. Enfin il en est quelques-unes qui n'en ont pas produit de trace; de ce nombre est un *Proteus* non liquéfiant, à colonies

sur gélatine envahissantes et caractéristiques (*Proteus Zenckeri* de Häuser ?) et un long Bacille liquéfiant la gelée et donnant une culture jaune sur pomme de terre.

Il est à remarquer que l'absence d'ammoniaque correspondait toujours à un développement très faible de l'espèce considérée dans le milieu albumineux, développement qui s'est très probablement effectué aux dépens des petites quantités de principes carbonés et azotés non albuminoïdes que renferme le blanc d'œuf.

On peut donc dire que les bactéries capables d'attaquer la molécule albuminoïde la désorganisent, en brûlent le côté carboné, laissant comme résidu l'ammoniaque.

Nous verrons qu'il en est de même pour les moisissures.

La production d'ammoniaque aux dépens d'albumine, par les bactéries, ne constitue donc pas une fonction propre à quelques organismes, comme le sont la nitrosation et la nitration; elle est l'apanage d'un grand nombre de microbes.

Il y a quelques années déjà, Duclaux (*) a montré que, dans la maturation des fromages, la caséine est transformée en composés ammoniacaux sous l'influence de microbes particuliers; plus récemment, Perdrix (**) a signalé la production d'ammoniaque dans les cultures de bactériidie charbonneuse; enfin Bienstock (***) a isolé des fèces plusieurs organismes présentant à un haut degré cette propriété.

(*) DUCLAUX, *Le lait*, p. 213.

(**) PERDRIX, *Sur la transformation des matières azotées dans les cultures de bactériidie charbonneuse*. Annales de l'Inst. Pasteur, 1886, p. 384.

(***) BIENSTOCK, *Ueber die Bacterien der Fäces*. Zeitschrift f. klinische Medizin, XIII.

En dehors des bactéries du sol, je l'ai observée chez un certain nombre d'espèces tant saprophytes que pathogènes, notamment : *Bacillus anthracis*, *diphtheriae*, *cholerae suum*, *tuberculosis avium*, *typhosus*, *megaterium*, chez le Bacille rouge de Kiel, le *Vibrio Metschnikovi*, le *Micrococcus prodigiosus*. Au contraire, le *Bac. pyocyaneus*, qui se développe très chétivement dans les solutions albumineuses, n'y produit pas d'ammoniaque.

7. J'ai cherché ensuite à déterminer quel était le pouvoir ammonisant particulier de quelques-unes des espèces les plus énergiques. Ces dernières ont étéensemencées dans des ballons renfermant 25 centimètres cubes d'une solution albumineuse dosant par litre 1^{er},565 d'azote organique (moyenne de trois dosages concordants effectués par le procédé Kjeldahl).

Les ballons ensemencés ont été placés, pendant vingt jours, à 30°, dans la chambre thermostatique. Après ce temps, on y a dosé l'ammoniaque produite.

Dans ce but, le liquide de culture est introduit avec une pincée (*) de magnésie calcinée dans le ballon de l'appareil distillatoire de Schloesing. Le tableau ci-après présente les chiffres obtenus.

Dans ce tableau, la seconde colonne indique les nombres obtenus directement par l'analyse des 25 centimètres cubes de culture, la troisième donne les mêmes chiffres rapportés au litre, c'est-à-dire multipliés par 40.

(*) L'ammoniaque se trouvant dans les cultures à l'état de carbonate ammonique, il suffit d'une quantité très faible d'alcali pour la dégager.

ESPÈCES BACTÉRIENNES.	AZOTE AMMONIACAL	AZOTE AMMONIACAL	POUR-CENT d'azote organique transformé.
	dans 25 cm ³ .	par litre.	
	Milligrammes.	Grammes.	
<i>Bacillus arborescens</i>	6,7	0,268	19
— <i>figurans</i>	8,0	0,320	23
— <i>fluorescens putidus</i>	7,5	0,300	22
— <i>fluorescens liquefaciens</i>	5,6	0,224	16
— <i>mesentericus vulgatus</i>	10,1	0,404	29
— <i>mycoïdes</i>	16,0	0,640	46
— <i>subtilis</i>	8,1	0,324	23
— <i>termo</i>	6,5	0,252	19
— <i>janthinus</i>	7,9	0,316	25
— <i>spec. 1.</i>	13,5	0,540	39
— <i>spec. 2.</i>	7,7	0,308	22
— <i>spec. 3.</i>	9,0	0,360	25
— <i>spec. 4.</i>	5,5	0,220	16
<i>Proteus vulgaris</i>	12,1	0,484	36
<i>Sarcina lutea</i>	9,5	0,380	27

On voit que, de toutes les Bactéries isolées du sol, le *Bacillus mycoïdes* est celle qui a le plus énergiquement transformé l'albumine en ammoniac; en vingt jours, près de la moitié de l'azote organique mis à sa disposition est passé à l'état d'alcali volatil.

C'est ce microbe que j'ai choisi pour en étudier, d'une

façon plus approfondie, l'action sur les matières albuminoïdes.

8. Je n'ai parlé jusqu'ici que des Bactéries. Comme je l'ai signalé récemment (*), la plupart des moisissures jouissent à un haut degré de la propriété de transformer en ammoniac les substances albuminoïdes, et peuvent, dans certaines conditions, jouer un rôle considérable dans l'ammonisation.

Une trentaine de moisissures et de formes bourgeonnantes, ensemencées dans la solution albumineuse à 10 ‰, ont donné les résultats consignés dans le tableau suivant :

ESPÈCES.	ÉTAT DE LA CULTURE.	RÉACTION DE NESSLER.
<i>Acrostalagmus cinnabarinus</i> (**).	Développement normal.	Ammoniacque.
<i>Aspergillus flavescens</i>	Id.	Id.
— <i>fumigatus</i>	Id.	Id.
— <i>glaucus</i>	Mycélium faible.	Pas d'ammoniacque.
— <i>terricola</i>	Développement normal.	Ammoniacque.
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	Id.	Id.
<i>Botrytis cinerea</i>	Id.	Id.
<i>Botrytis Bassiana</i>	Id.	Id.
<i>Cephalothecium roscum</i>	Id.	Id.

(*) MARCHAL, De l'action des moisissures sur l'albumine. Bulletin de la Société belge de Microscopie, t. XIX, p. 65, 1895.

(**) La nomenclature adoptée pour les moisissures dans ce travail est celle du *Sylloge Fungorum* de Saccardo.

ESPÈCES.	ÉTAT DE LA CULTURE.	RÉACTION DE NESSLER.
<i>Circinella umbellata</i>	Formes-levures.	Ammoniaque.
<i>Fusoma alba</i>	Id.	Id.
<i>Isaria farinosa</i>	Développement normal.	Id.
<i>Mucor corymbifer</i>	Id.	Id.
— <i>spinus</i>	Formes-levures.	Id.
— <i>plumbeus</i>	Id.	Id.
— <i>racemosus</i>	Id.	Id.
<i>Mycogone rosea</i>	Développement normal.	Id.
<i>Oospora grandiuscula</i>	Mycélium faible.	Pas d'ammoniaque.
<i>Oospora spec</i>	Développement normal.	Ammoniaque.
<i>Penicillium glaucum</i>	Développement très faible.	Pas d'ammoniaque.
— <i>cladosporioides</i>	Développement normal.	Ammoniaque.
— <i>spec. 1</i>	Id.	Id.
— <i>spec. 2</i>	Id.	Id.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Id.	Id.
<i>Saccharomyces glutinis</i>	Id.	Id.
<i>Sporotrichum globulifer</i>	Id.	Id.
<i>Stachybotrys alternans</i>	Id.	Id.
<i>Stemphylium spec.</i>	Id.	Id.
<i>Sterigmatocystis dubia</i>	Développement faible.	Pas d'ammoniaque.
<i>Sterigmatocystis niger</i>	Id.	Id.
<i>Streptothrix Foersteri</i>	Développement normal.	Ammoniaque.
<i>Syncephalastrum elegans</i>	Mycélium faible.	Pas d'ammoniaque.
<i>Trichoderma viride</i>	Développement normal.	Ammoniaque.

Il résulte de ce tableau que toutes les moisissures qui ont présenté, dans la solution albumineuse, un développement normal, ont donné lieu à la production d'ammoniaque.

Les chiffres suivants, obtenus après quinze jours de culture à la température de 18°, dans une solution albumineuse dosant 1^{er},365 d'azote organique par litre, donnent une idée du pouvoir ammonisant de quelques-unes des espèces citées plus haut.

ESPÈCES.	AZOTE AMMONIACAL	AZOTE AMMONIACAL
	dans 50 cm ³ .	par litre.
	Milligrammes.	Grammes.
<i>Aspergillus terricola</i>	21,6	0,452
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	16,2	0,324
<i>Cephalothecium roseum</i>	25,1	0,502
<i>Stemphylium spec.</i>	3,6	0,072
<i>Streptothrix Foersteri</i>	14,1	0,282

On peut se demander quels sont, des moisissures ou des bactéries, les agents essentiels de l'ammonisation.

Dans la terre arable livrée à une culture intensive, les moisissures n'existent qu'en quantités relativement faibles, grâce à la réaction alcaline du milieu et à l'absence de matière organique en grande quantité. L'action des bactéries y est prédominante.

Dans les sols humeux, acides, au contraire, riches en matières organiques, dans l'humus des forêts, certains terreaux, j'ai rencontré des mycéliums nombreux de moisissures, et il n'est pas douteux qu'elles interviennent activement dans la minéralisation de l'azote organique.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DU BACILLE MYCOÏDE.

9. Le *Bacillus mycoïdes*, Bacille de la terre (*Erde-Bacillus* des auteurs allemands), décrit pour la première fois par Flügge (*), a été signalé depuis par Fränkel (**) qui en a donné également une description sous le nom de *Wurzelbacillus*.

C'est cette espèce que Hueppe et Wood (***) ont rencontrée dans le sol, et qui, d'après leurs recherches, confère au lapin l'immunité contre l'injection de cultures virulentes de bactérie charbonneuse.

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES. — Cette intéressante bactériacée se présente sous l'aspect de bâtonnets ordinairement une fois et demie aussi longs que larges, à extrémités nettes et un peu arrondies, rarement isolés, le plus fréquemment réunis en longs pseudo-filaments dont les articles paraissent nettement séparés par un espace clair.

Le Bacille mycoïde produit aisément des spores grosses, ovales, réfringentes, qui occupent la partie médiane des articles.

Les pseudo-filaments sont immobiles, de même que les bâtonnets libres; cependant, dans certaines cultures, j'en ai observé qui étaient animés d'un mouvement pendulaire très lent.

(*) FLÜGGE, *Die Mikroorganismen*.

(**) FRÄNKEL, *Grundriss der Bakterienkunde*, p. 241.

(***) HUEPPE et WOOD, *Parasitism und Saprophytism*.

CARACTÈRES MACROSCOPIQUES. *Culture sur plaques de gélatine*. — Le développement des colonies sur plaques de gélatine est à la fois des plus remarquables et des plus caractéristiques.

Pour bien l'observer, on coule dans une boîte de Petri le contenu d'un tube de gélatine ensemencé à l'aide d'une dilution très faible de culture, de manière à n'obtenir sur la plaque qu'une ou deux colonies.

Après vingt-quatre heures, à la température de 18° à 20°, la boîte retournée, examinée à l'aide d'un grossissement d'environ 100 diamètres, laisse voir de petites colonies rondes, foncées, granuleuses, à contour très net. Après quelques heures, le contour perd de sa netteté, il s'en détache dans tous les sens des filaments qui forment bientôt, par leur enchevêtrement, un feutrage dense dans lequel a disparu la petite colonie primitive.

A ce stade, ces colonies, examinées à l'œil nu, apparaissent comme un léger nuage blanc sur la gélatine; celle-ci ne présente encore aucune trace de liquéfaction.

Le mode d'extension de ces colonies sur la gelée est très curieux.

La colonie primitive émet, dans plusieurs directions, des faisceaux de filaments droits ou contournés en spirales souvent très régulières. Après quelque temps de croissance dans un sens, ces filaments se pelotonnent sur eux-mêmes, donnant naissance à des colonies secondaires; celles-ci, à leur tour, lancent en tous sens des trainées filamenteuses qui vont, par la fondation de colonies nouvelles, exploiter des surfaces gélatineuses encore vierges.

Une seule colonie peut, de cette façon, recouvrir toute une plaque d'un réseau inextricable de filaments entre-

croisés. Mais, en même temps que cette extension se manifeste, la gélatine se liquéfie; c'est tout d'abord le centre de la colonie-mère qui se ramollit, s'affaisse et tombe en déliquescence. Cette liquéfaction s'étend circulairement, atteint bientôt les colonies secondaires pour se propager, enfin, le long des trainées filamenteuses, à toute la plaque. Ce résultat n'est atteint qu'après six à sept jours de culture.

Culture par piqûre sur gélatine. — Si l'on inocule un tube de gélatine, par piqûre, avec le Bacille mycoïde, on observe les faits suivants : après deux jours apparaît, dans le canal de la piqûre, un léger enduit blanchâtre, tandis qu'à la surface s'est développée une colonie déjà assez étendue. Bientôt du canal se développent, perpendiculairement et en tous sens, de fins filaments droits qui finissent par atteindre les parois du tube. L'ensemble rappelle alors une jeune radicule munie de ses poils absorbants. En même temps, la liquéfaction s'opère à la surface, qui se creuse en une cupule remplie d'un liquide limpide dans lequel flotte un flocon duveteux. Cette liquéfaction gagne en profondeur, les étages de filaments s'affaissent de plus en plus, et, après dix à quinze jours, il reste au fond du tube des flocons blancs que surnage la gélatine limpide et liquéfiée.

Culture sur agar en surface. — Sur agar nutritif, le développement est très rapide et caractéristique.

Du trait d'inoculation superficielle partent des trainées filamenteuses constituant des arborescences irrégulières qui s'étendent rapidement à toute la surface de la gelée.

L'agar n'est pas liquéfié.

Culture sur sérum. — Sur sérum solide, en plan incliné, le développement est identique à la culture sur agar, si ce n'est que le sérum est peu à peu liquéfié.

Culture sur pomme de terre. — Cette culture ne présente rien de bien caractéristique et s'est montrée très variable dans ses aspects.

Le plus souvent la pomme de terre se couvre rapidement d'un enduit blanchâtre, peu épais, qui ne se plisse pas par la dessiccation.

D'autres formes du Bacille mycoïde ont présenté une coloration tantôt jaunâtre, tantôt rosée. Cette dernière variété est peut-être identique au *Bacillus mycoïdes roseus* de Holschewnikoff (*).

Culture en bouillon. — Le développement en bouillon est en tous points identique à celui de la bactérie charbonneuse.

Déjà 8 à 10 heures après l'ensemencement à 30°, on voit se produire de légers flocons ; ces flocons augmentent en nombre et en dimensions, ils nagent dans un liquide resté limpide ; agitée, la culture ne devient pas laiteuse.

Après quelques jours, les flocons se désagrègent et il se forme au fond du vase de culture un dépôt pulvérulent. Si l'on agite, ce sédiment se répand dans toute la masse du liquide, qui devient trouble et laiteux. L'examen microscopique montre que les flocons sont constitués par la Bactérie en longs filaments. Plus tard, ces filaments se

(*) HOLSCHEWNIKOFF, *Fortschritte der Medicin*. Bd. VII, S. 46.

résolvent en spores qui tombent au fond des récipients de culture constituant le dépôt que l'on y observe.

Dans les solutions de blanc d'œuf, de même que dans le sérum dilué, le développement est identique à ce qui vient d'être décrit.

Tels sont les caractères de culture du Bacille mycoïde tels qu'ils se sont présentés le plus généralement.

Cependant des différentes formes de ce microbe que j'ai isolées, il s'en est trouvé chez lesquelles ces caractères étaient quelque peu modifiés.

Sans parler des cultures sur pomme de terre, sur les modifications desquelles j'ai déjà insisté plus haut, le développement sur plaques de gélatine peut varier par le mode d'extension et la liquéfaction plus ou moins rapide de la gélatine. Certaines cultures en piqûre ne présentaient que des filaments rudimentaires; enfin la rapidité de dissolution du sérum s'est montrée également très variable.

En somme, on voit que le *Bacillus mycoïdes* jouit d'une certaine variabilité dans ses caractères morphologiques.

Dispersion. — Le Bacille mycoïde est extrêmement répandu dans la nature; sa présence est constante dans les couches supérieures du sol cultivé.

Indépendamment des terres de toutes natures que j'ai étudiées, j'ai isolé cette Bactérie fréquemment du fumier, du terreau, de composts et de l'humus des forêts.

On la rencontre également dans l'air et dans les eaux naturelles.

10. ACTION DU BACILLE MYCOÏDE SUR L'ALBUMINE. — La propriété physiologique essentielle du Bacille mycoïde est de transformer, par voie d'oxydation, les substances azotées en ammoniacque.

Si cette fonction est constante chez ce microbe, elle n'en est pas moins susceptible de varier dans des limites assez étendues, et les diverses cultures que j'ai eues à ma disposition ont montré des aptitudes notablement différentes.

Pour le démontrer, j'ai ensemencé dans une solution albumineuse faible (1^{er}, 365 d'azote organique par litre) ces différentes variétés, dont voici la provenance :

1. Terre de Jardin (Institut botanique).
2. Fumier décomposé (Woluwe-Saint-Lambert).
3. Terreau gras (Crainhem).
4. Terre de champ fumée (Roodebeke).
5. Humus de forêt (forêt de Soignes).
6. Terre sableuse (Watermael).
7. Compost de feuilles (Wesembeek)
8. Culture provenant de l'Institut Pasteur.

Après vingt jours de culture à 30°, les quantités suivantes d'ammoniacque étaient observées :

VARIÉTÉS.	AMMONIAQUE	AMMONIAQUE
	dans 50 cm ³ .	par litre.
	Milligrammes.	Grammes.
1	24,0	0,480
2	14,2	0,284
3	21,6	0,432
4	39,6	0,792
5	34,8	0,696
6	19,8	0,396
7	20,4	0,408
8	17,5	0,350

On voit donc que, d'une forme à l'autre, les quantités d'ammoniaque produites ont, abstraction faite de l'individualité des cultures, varié presque du simple au double.

C'est la variété 4, la plus énergique, qui a été prise comme point de départ des expériences dans lesquelles j'ai cherché à déterminer l'équation du phénomène et l'action qu'exercent les agents extérieurs sur son intensité.

11. Mécanisme du phénomène. — Pour établir l'équation du phénomène, je me suis basé sur les considérations suivantes :

A. Lorsqu'on ensemence du Bacille mycoïde dans une solution albumineuse neutralisée, on constate qu'après quelque temps, la réaction devient fortement alcaline : cette alcalinité est due à la présence de carbonate d'ammoniaque dans le liquide de culture.

La simple ébullition de ce dernier fait dégager la plus grande partie de l'alcali volatil ; après ce traitement, il donne encore un précipité avec le réactif de Nessler, dû à de petites quantités d'ammoniaque unie à des acides gras. L'addition d'une très petite quantité de magnésie calcinée provoque, à l'ébullition, le départ de la totalité de l'ammoniaque.

En même temps que de l'ammoniaque s'est formée, une grande quantité d'albumine a disparu. L'azote de l'albumine disparue correspond sensiblement à celui de l'alcali formé.

B. Si l'on analyse l'atmosphère mise en rapport avec la culture, on constate à la fin de l'expérience ;

1° Une absorption considérable d'oxygène ;

2° L'émission concomitante d'acide carbonique.

Le volume d'acide carbonique émis est notablement

inférieur à celui de l'oxygène absorbé, une portion notable du premier restant fixée dans la liqueur sous forme de carbonate d'ammoniaque.

3° L'absence complète d'hydrogène et d'azote dans les produits gazeux de la fermentation.

Dans ces recherches, en atmosphère confinée, j'ai fait usage, entre autres dispositifs, de l'appareil suivant, analogue à celui que Roth (*) a préconisé depuis pour la culture des anaérobies.

C'est un ballon A contenant la solution albumineuse, fermé par un tampon d'ouate traversé par un tube de verre *a*, portant à sa partie supérieure un bout de caoutchouc et une pince.

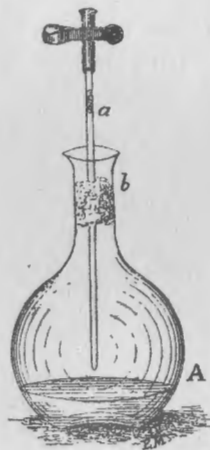


FIG. 4.

(*) ROTH, *Ueber ein einfaches Verfahren der Anaerobenzüchtung.* Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. XIII, 1895, n° 7.

Le tout est stérilisé à l'autoclave à 115°.

Après refroidissement, onensemence de la façon ordinaire, en soulevant le tampon d'ouate que l'on replace rapidement en ayant soin de l'enfoncer jusqu'en *b*, de manière à laisser au-dessus un espace libre.

Par le tube *a*, on fait venir un courant d'oxygène pur dans le cas présent, d'hydrogène ou de gaz d'éclairage quand il s'agit de cultures anaérobies.

On laisse passer le gaz pendant longtemps afin de purger complètement l'appareil de l'air qu'il renfermait; lorsque ce résultat est atteint, on ferme la pince et on coule, dans l'espace laissé libre au-dessus du tampon d'ouate, de la paraffine fondue qui, en se figeant, produit une fermeture hermétique.

L'atmosphère du ballon est ainsi constituée d'oxygène pur; après culture, on fait passer les gaz dans l'eudiomètre pour rechercher les modifications qu'ils ont subies.

C. Lorsqu'on dose simultanément l'acide carbonique et l'ammoniaque produits par la respiration du microbe, on constate que ces corps se dégagent dans une proportion qui se rapproche beaucoup de celle qui correspond à la combustion complète de l'albumine.

Pour effectuer ces dosages, j'ai eu recours au dispositif suivant :

Un ballon d'un demi-litre *A*, contenant 50 centimètres cubes d'une solution albumineuse faible, est fermé à l'aide d'un bouchon en caoutchouc percé de deux trous livrant passage à des tubes de verre fermés par un tampon de coton; l'un d'eux est muni d'une pince à sa partie supérieure.

Après stérilisation et ensemencement, le tube *b* est réuni

à un tube à boules *B* contenant 10 centimètres cubes d'acide sulfurique titré, et celui-ci au flacon *C* renfermant de l'eau de baryte. Le tube à boules *D* à potasse protège l'appareil contre l'acide carbonique extérieur.

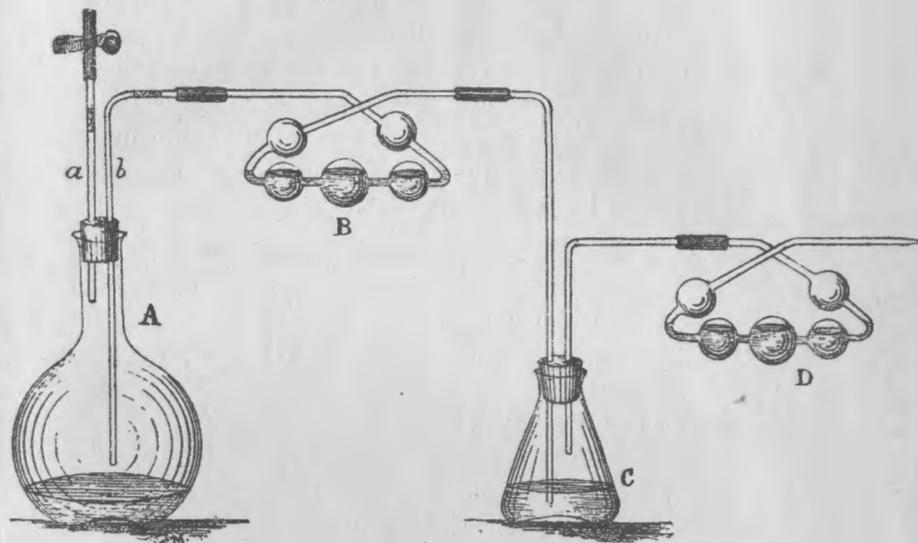


FIG. 2.

Le microbe se développe, produit de l'ammoniaque et de l'acide carbonique; ce dernier sature tout d'abord l'alcali formé et l'excédent est absorbé par la baryte.

De temps en temps, on renouvelle l'atmosphère de la culture; dans ce but, *D* est réuni à une trombe. Pour débarrasser d'acide carbonique l'air aspiré en *a*, on le fait passer dans un tube d'absorption à potasse.

Après quinze jours de culture à 30°, on provoque dans

l'appareil une circulation lente et prolongée d'air pour chasser en C l'acide carbonique produit. Par le tube *a*, on introduit quelques gouttes d'acide sulfurique, afin de décomposer le carbonate d'ammoniaque formé, et on plonge le ballon A dans un bain d'eau à 40° pour faciliter le dégagement de l'acide carbonique.

Après avoir fait passer de l'air pendant un temps suffisant, on dose l'ammoniaque dans le ballon A et dans le tube à boules B, qui a pu retenir des vapeurs ammoniacales, et l'acide carbonique dans le flacon C.

J'ai obtenu les chiffres suivants :

	Milligrammes.
Ammoniaque	8,0
Acide carbonique	71,6

Rapport entre ces deux corps : 1 : 8,9.

Or, le rapport théorique entre l'ammoniaque et l'acide carbonique produits par la combustion complète de l'albumine est, en poids, de 1 : 10,55 (en prenant comme point de départ la formule de Zinoffski).

Le déficit en acide carbonique est dû, sans doute, à la fixation d'une partie du carbone dans le liquide de culture à l'état d'acide gras.

D. En dehors de l'acide carbonique et de l'ammoniaque, l'analyse décèle la présence, en petites quantités, dans les liquides fermentés, des corps suivants : peptones, leucine, tyrosine, acides gras (acides formique, butyrique et propionique).

Les peptones ont été caractérisées, dans le liquide débarrassé des albuminoïdes par la réaction du biuret; la

leucine et la tyrosine, dans l'extrait glycérique, par leurs formes cristallines.

Pour la recherche des acides gras, j'ai distillé 500 centimètres cubes de culture additionnés d'acide sulfurique. Dans le distillat, l'acide formique a été mis en évidence par un sel d'argent; les acides butyrique et propionique par le procédé de Duclaux (*).

E. Le soufre de l'albumine se retrouve à l'état d'acide sulfurique.

De ces différents faits, on peut déduire la conclusion suivante :

Sous l'influence du Bacille mycoïde, l'oxygène se porte sur les éléments de l'albumine, le carbone est transformé en acide carbonique, le soufre en acide sulfurique, une partie de l'hydrogène en eau, et l'ammoniaque se dégage en quelque sorte comme résidu.

La production d'ammoniaque apparaît ici comme le corollaire d'un phénomène respiratoire.

Envisagé de la sorte, le dégagement d'ammoniaque, aux dépens de l'albumine, peut être rapproché de la production de soufre aux dépens d'hydrogène sulfuré, telle que Winogradsky l'a indiquée pour les sulfobactéries (**).

Dans les deux cas, une partie de la molécule est oxydée, fournissant au microbe une certaine quantité d'énergie, et l'ammoniaque, comme le soufre, constitue le résidu de la réaction.

(*) DUCLAUX, *Annales de chimie et de physique*, série V, t. III, 1874.

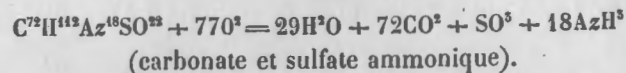
(**) WINOGRADSKY, *Recherches sur les sulfobactéries*. *Annales de l'Inst. Pasteur*, t. III, 1889.

L'analogie ressort nettement de la comparaison des deux équations.

Sulfobactéries :



Microbes ammonisants :



Cette combustion complète de l'albumine par le microbe est influencée par divers facteurs : température, aération, réaction et concentration du milieu.

12. Influence de la température. — La température active, d'une façon remarquable, les phénomènes d'oxydation qui s'accomplissent dans le sol.

Schlœsing et Muntz ont montré que c'est vers 35° que la nitrification atteint son maximum d'intensité.

J'ai cherché à déterminer quelle est, pour l'ammonisation, la température optima.

Dans ce but, j'ai ensemencé du Bacille mycoïde dans des ballons renfermant 25 centimètres cubes d'une solution diluée de blanc d'œuf dosant 1^{er},365 d'azote organique par litre.

Les 50 ballons ensemencés ont été partagés en séries de 5, qui furent placés simultanément aux températures suivantes : 0° à 5°, 10°, 20°, 30°, 37°, 42°. Après trente jours de culture, j'ai obtenu les quantités suivantes d'ammoniaque :

TEMPÉRATURE.	BALLONS 1.	BALLONS 2.	BALLONS 3.	BALLONS 4.	BALLONS 5.	MOYENNES.
0° à 5°	Traces. Milligrammes.	Traces. Milligrammes.	Traces. Milligrammes.	Traces. Milligrammes.	Traces. Milligrammes.	Traces. Milligrammes.
10	1,5	3,0	2,6	1,8	— (*)	2,2
20	8,1	9,8	10,1	11,5	8,3	9,6
30	16,8	18,0	14,1	15,1	15,3	15,8
37	9,3	13,2	12,1	10,2	— (*)	11,2
42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Les résultats moyens indiqués dans la dernière colonne de ce tableau montrent que de 0° à 5° il n'y a eu que des traces d'ammoniaque dans les liquides de culture; le réactif de Nessler n'y déterminait qu'une coloration jaune peu intense; le microbe s'est cependant développé abondamment à cette température; toutefois, le stade floconneux a persisté jusqu'à la fin, les filaments ne se résolvant pas en spores.

A 10°, la production d'ammoniaque est encore faible; elle ne devient notable qu'à 20°, pour atteindre son maximum vers 30°.

A 37°, le phénomène a perdu de son intensité, le développement du microbe est moins luxuriant, il cesse complètement à 42°.

Le Bacille mycoïde ne compte donc pas parmi les nombreuses espèces thermophiles que M. Globig (**) paraît avoir isolées du sol.

(*) Ces dosages n'ont pu être effectués à cause d'accidents survenus aux cultures.

(**) GLOBIG, Ueber Bacterien-Wachsthum bis 50°-70°. Zeitschrift f. Hygiene, t. III.

Il n'en est pas de même pour un bacille désigné plus haut sous la dénomination de *Bac. spec. 3*, très intéressant, qui, même à 60°, se développe d'une façon luxuriante et sporule abondamment. Je reviendrai prochainement sur ce curieux organisme.

13. Influence de l'aération. — En l'absence de nitrates (*), le Bacille mycoïde est essentiellement aérobie; il est incapable de se développer dans le vide de même que dans une atmosphère d'hydrogène ou d'acide carbonique.

L'oxydation de l'albumine étant intimement liée à la respiration du microbe, elle s'accomplit le mieux lorsque l'oxygène se trouve en grande quantité dans le milieu ambiant.

C'est ce qu'une expérience très simple montre de la façon la plus évidente.

On ensemence du Bacille dans les divers récipients suivants, qui reçoivent chacun 35 centimètres cubes de solution albumineuse :

- | | | | |
|--|---|---|-------|
| 1. Ballon dans lequel on fait ultérieurement le vide. | | | |
| 2. Tube long et étroit, où la profondeur du liquide est de 12 centimètres. | | | |
| 3. Ballon ordinaire | — | — | 5 — |
| 4. Ballon très large | — | — | 2.5 — |

Les quatre cultures sont abandonnées pendant quinze

(*) On verra plus loin que cette restriction est nécessaire.

jours à 30°. Après ce temps, on y dose l'ammoniaque. Voici les résultats obtenus :

CULTURE.	AMMONIAQUE	AMMONIAQUE
	dans 25 cm ³ .	par litre.
	Milligrammes.	Grammes.
1	0,0	0,000
2	4,2	0,168
3	8,5	0,340
4	12,5	0,500

Dans le vide, il n'y a eu aucun développement et aucune production d'ammoniaque, et l'on voit qu'en présence d'air, les quantités d'alcali formées sont d'autant plus fortes que l'épaisseur de la couche liquide est moins grande, autrement dit que la surface exposée au contact de l'air est plus considérable.

Mais quelle que soit l'étendue de ces surfaces, les conditions d'aération réalisées dans ces expériences, sont de bien loin inférieures à celles que présente le sol.

La terre est, en effet, constituée de fines particules enveloppées d'une mince couche d'eau, plongeant dans l'atmosphère du sol et dans laquelle végètent les microbes. Ces derniers se trouvent donc en contact intime avec les gaz du sol, atmosphère qui, tout au moins dans les couches superficielles, est presque aussi riche que l'air en oxygène (*).

(*) TH. SCHLOESING fils, *Sur l'atmosphère contenue dans le sol.* Comptes rendus, t. CIX, p. 673.

Les résultats obtenus dans les cultures artificielles ne doivent donc être considérés que comme des minima.

14. Influence de la réaction du milieu. — La réaction du milieu est, plus qu'on ne le pense généralement, un facteur important dans la chimie du sol; elle influe d'une façon remarquable sur les procès qui s'y accomplissent.

En sol acide, la décomposition des matières organiques est très lente; si, par l'application de chaux, de marne, d'un phosphate très basique, on vient modifier cette réaction, la minéralisation des substances organiques s'accomplit rapidement, ce qui se traduit naturellement par une vigueur toute particulière de la végétation.

C'est que les agents par excellence de l'oxydation des matières organiques, — les bactéries, — se développent de préférence dans un milieu alcalin.

Winogradsky a montré que le ferment nitreux ne peut se développer que s'il existe dans le milieu une base, un carbonate de magnésic, de chaux, etc.

Si donc la réaction est acide, la nitrosation est entravée.

Il était intéressant de rechercher la sensibilité du ferment ammonisant aux variations de réaction du milieu.

J'aiensemencé du Bacille mycoïde dans du bouillon neutralisé (*), additionné de quantités croissantes d'acide sulfurique.

(*) L'emploi de la solution albumineuse m'était interdit dans cette expérience, l'acide employé précipitant l'albumine.

Voici les résultats obtenus :

CULTURE.	ACIDE SULFURIQUE par litre.	ÉTAT DE LA CULTURE.
	Grammes.	
1	0,1	Développement.
2	0,2	Id.
3	0,5	Id.
4	1,0	Pas de développement.
5	2,0	Id.
6	3,0	Id.
7	4,0	Id.
8	5,0	Id.

Comme on le voit, des quantités de 0^{gr},1 à 0^{gr},5 d'acide par litre n'ont pas entravé le développement du microbe; dans ces trois cultures, la réaction est devenue, après quelque temps, fortement alcaline.

Après quinze jours de séjour à la chambre thermostatique à 30°, l'alcalinité de la culture 3 correspondait à 0^{gr},525 de potasse caustique par litre.

On suit facilement les variations de réaction dans ces expériences en ajoutant à la culture quelques gouttes de teinture de tournesol, dont on voit se modifier la coloration.

Le ferment ammonisant supporte donc un certain degré d'acidité.

Ce fait explique sa présence dans l'humus des bois, dans certains terrains où je l'ai rencontré.

Indépendamment de l'action des moisissures, l'ammo-

nisation peut donc s'accomplir dans des sols acides où la production des nitrates est impossible.

Des nombreuses analyses de terres diverses effectuées par Petermann (*), il résulte que les composés ammoniacaux se rencontrent normalement dans les sols de prairies, de sapinières, de landes et de bruyères, qui tous présentent généralement une certaine acidité.

Si le Bacille mycoïde résiste à une faible acidité, le milieu alcalin n'en est pas moins celui qui favorise le plus son développement; il résiste à l'addition aux solutions nutritives de quantités relativement considérables de potasse caustique.

CULTURE.	POTASSE CAUSTIQUE par litre.	ETAT DE LA CULTURE.
	Grammes.	
1	0,1	Développement.
2	0,2	Id.
3	0,5	Id.
4	1,0	Id.
5	2,0	Id.
6	3,0	Pas de développement.
7	4,0	Id.
8	5,0	Id.
9	6,0	Id.
10	10,0	Id.

(*) PETERMANN, *Recherches de chimie et de physiologie appliquées à l'agriculture*. Bruxelles, 1886, p. 560.

L'alcalinité des cultures est encore, par suite de la production d'ammoniaque, peu à peu augmentée.

15. *Influence de la concentration des solutions.* — Perdrix (*) a fait voir que plus un bouillon est riche en matière azotée, plus est faible la proportion de cette matière transformée en ammoniaque par la bactérie charbonneuse.

J'ai recherché s'il en était de même avec le Bacille mycoïde.

J'ai donc cultivé le microbe dans des solutions de moins en moins riches en azote albuminoïde.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

SOLUTION.	AZOTE ALBUMINOÏDE au début dans 25 cm ³ .	AZOTE AMMONIACAL à la fin dans 25 cm ³ .	POUR CENT d'azote organique transformé.
	Milligrammes.	Milligrammes.	
1	80,0 ^(**)	34,3	42,9
2	64,0	29,5	46,1
3	48,0	22,7	47,3
4	32,0	18,0	56,2
5	16,0	13,8	86,2
6	6,4	6,3	98,4
7	3,2	3,3	100,0
8	1,6	1,4	100,0

(*) PERDRIX, *loc. cit.*

(**) Solution à 20 % environ de blanc d'œuf dans laquelle l'azote a été dosé par le procédé Kjeldahl; elle a été rendue incoagulable par l'addition de 15 cm³ de solution au 1/1000 de sulfate de fer par litre.

Les autres solutions en dérivent par dilution.

Dans les solutions très diluées, l'azote organique a été complètement transformé en ammoniacque; c'est ce qui a eu lieu dans les trois dernières solutions (la différence de 0^{mm},2 entre l'azote albuminoïde et l'azote ammoniacal de la dernière solution rentrant dans les limites d'erreur des dosages).

Ensuite, à mesure que la concentration augmente, la proportion d'ammoniacque diminue. En même temps on constate que les produits résiduels de l'activité du microbe, les acides odorants, apparaissent en quantités beaucoup plus considérables.

Les cultures en solutions étendues ne dégagent aucune odeur; les liquides concentrés, au contraire, présentent une odeur très intense à la fois butyrique et ammoniacale.

ACTION DU BACILLE MYCOÏDE SUR LES DIFFÉRENTES SUBSTANCES AZOTÉES.

16. Substances albuminoïdes. — Je n'ai parlé jusqu'ici que de l'action du Bacille mycoïde sur l'albumine de l'œuf, mais j'ai tenu à m'assurer aussi que son action est identique sur les autres substances albuminoïdes et sur les peptones.

J'ai opéré de la façon suivante.

Dans des ballons contenant 25 centimètres cubes de la solution minérale que voici :

Eau	1000
Phosphate bipotassique	1
Chlorure de sodium	0,5
Sulfate de magnésium	0,5,

j'ai ajouté respectivement les substances suivantes :

caséine, fibrine, gélatine, gluten, légumine, myosine, peptone.

Deux ballons sont ainsi pourvus des mêmes composés albuminoïdes; après stérilisation, l'un d'eux estensemencé de Bacille mycoïde, l'autre est laissé stérile et servira de témoin.

Après vingt jours de culture à 30°, j'ai obtenu les résultats consignés dans le tableau qui suit.

SUBSTANCES.	DOSES	AMMONIAQUE	AMMONIAQUE
	dans 25 cm ³ de liquide minéral.	dans le ballon témoin (*).	dans les cultures.
	Grammes.		Milligrammes.
Caséine. .	0,2	Traces.	10
Fibrine. .	0,2	Milligrammes. 0,0	11,6
Gélatine .	0,25	0,0	18,5
Gluten . .	0,2	0,0	4,5
Légumine.	0,2	Traces.	12,4
Myosine .	0,1	2,5	8,5
Peptone .	0,25	Traces.	22,0

Ces diverses substances, et particulièrement les peptones, ont donc été énergiquement transformées en ammoniacque.

Il en est de même de la sérine du sang.

Du sérum, dilué au quart, contenait, après quinze jours de culture à 30°, 16,5^{mm} d'ammoniacque dans 25 centimètres cubes.

(*) Provenant d'impuretés.

On vient de voir que la caséine est comburée par le microbe; sa destruction est bien plus complète encore lorsqu'on prend comme milieu de culture du lait normal stérilisé. Dans ces conditions, le Bacille se développe avec beaucoup d'énergie, le lait change bientôt d'aspect, la crème se sépare et vient occuper la surface du liquide, tandis que le sérum sous-jacent se colore peu à peu en jaune, puis en jaune brun qui se fonce de plus en plus. Après un mois de culture, j'ai observé, dans des laits différents, les quantités suivantes d'ammoniaque :

Lait 1.	45 ^{mmg} ,8 dans 25 centimètres cubes,
Lait 2.	39 ^{mmg} ,3 dans 25 centimètres cubes,

ce qui fait respectivement 1^{er},832 et 1^{er},572 d'ammoniaque produite par litre.

Malgré ces grandes quantités d'ammoniaque, le lait ne présentait pas, après culture, une forte réaction alcaline.

Ce fait est dû à la production, aux dépens de la lactose, d'acides qui ont neutralisé l'ammoniaque au fur et à mesure de sa production.

17. Substances azotées non albuminoïdes. — J'ai dit que la leucine et la tyrosine sont des produits résiduels de l'activité du microbe; ces substances peuvent-elles, à leur tour, être transformées en ammoniaque? En est-il de même de la créatine, de l'asparagine, de l'urée?

Pour répondre à ces questions, il a été fait des cultures du Bacille mycoïde dans la liqueur minérale de tantôt, additionnée de 5 grammes par litre de saccharose et des corps azotés à étudier.

Voici les résultats obtenus après dix-huit jours de culture à 30°.

SUBSTANCES.	QUANTITÉS	AMMONIAQUE	AMMONIAQUE
	dans 25 cm ³ de liquide minéral.	dans les témoins (*).	dans les cultures.
	Grammes.	Milligrammes.	Milligrammes.
Leucine .	0,1	1,5	5,8
Tyrosine .	0,1	1,0	6,7
Créatine .	0,1	Traces.	3,4
Asparagine.	0,25	Traces.	22,0

L'asparagine, la leucine, la tyrosine, et à un moindre degré la créatine, ont donc été transformées en ammoniaque.

Il n'en est pas de même de l'urée. Ce corps se dédouble facilement en carbonate d'ammoniaque, j'ai préparé les solutions par le procédé indiqué par Leube (**) et qui consiste à stériliser à part l'urée solide et bien desséchée, qui supporte alors sans danger une température de 100°.

L'urée était disposée dans de petites ampoules de verre que l'on mettait quelques heures à l'étuve à air chaud et qu'on laissait tomber ensuite dans les ballons renfermant la solution minérale sucrée stérilisée.

(*) Provenant d'impuretés.

(**) LEUBE, *Ueber die ammoniakalische Hämogähmung*. Virchow's Archiv, t. C, p. 540.

Comme des contaminations auraient pu se produire pendant ces manipulations, les récipients de culture étaient mis deux jours à la chambre thermostatique et l'on n'ensemait que ceux où ne se manifestait aucun trouble bactérien.

Dans ces solutions, le Bacille mycoïde n'a présenté aucun développement. L'urée ne constitue donc pas un aliment azoté pour ce microbe.

Le nitrate d'urée et les sels ammoniacaux sont dans le même cas. A plusieurs reprises, j'ai essayé de cultiver le bacille dans une solution minérale sucrée, additionnée de 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque; jamais je n'ai observé le moindre trouble dans la liqueur.

18. Nitrates. — La culture avec nitrates comme source d'azote est des plus intéressantes et montre combien les aptitudes physiologiques du microbe varient avec le milieu.

Si l'on ensemence du Bacille mycoïde dans la solution minérale sucrée de tout à l'heure, additionnée de 2 grammes par litre de nitrate de soude, on constate que, durant les premiers jours, le développement est extrêmement lent. Après deux ou trois jours cependant, apparaissent dans le liquide des flocons denses et nombreux.

Si l'on traite une portion du liquide de culture par le réactif de Griess (*) et une autre partie par le réactif de Nessler, on constate la présence simultanée de nitrites et

(*) Acide sulfanilique, acide chlorhydrique, chlorure de naphthylamine.

d'ammoniaque; ce dernier se trouve surtout en grande quantité.

Ce processus de réduction, déjà signalé chez ce microbe par de Blasi et Russo Travali (*), présente une énergie telle, qu'après dix à quinze jours tout l'azote nitrique est transformé en ammoniaque, et le liquide de culture ne donne plus de réaction avec la diphenylamine sulfurique.

Il est curieux de voir le même microbe agir tantôt en oxydant, vis-à-vis de l'albumine, tantôt en réducteur, en présence de nitrates.

Les phénomènes d'oxydation et ceux de réduction ne sont donc pas nécessairement l'apanage d'organismes distincts : tous deux sont intimement liés à la respiration des microbes, respiration normale dans le cas de l'oxydation, respiration intramoléculaire lorsqu'il s'agit de réduction.

Le Bacille mycoïde se développant en aérobie dans les solutions de blanc d'œuf, brûle l'albumine à l'aide de l'oxygène de l'air, tandis que dans les solutions de nitrates additionnées de sucre, il brûle ce dernier en enlevant l'oxygène nécessaire à cette combustion aux nitrates, corps oxygénés et très facilement réductibles.

Les recherches de Laurent (***) ont montré, en effet, que les nitrates sont aisément réduits, non seulement sous l'influence d'agents organisés (bactéries, levures, moisissures), mais encore de facteurs purement physiques (lumière solaire).

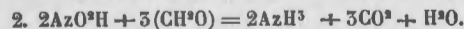
(*) DE BLASI et RUSSO TRAVALI, *Gazetta chimica italiana*, 1889, p. 440.

(**) LAURENT, *Notes sur la réduction des nitrates par les plantes et par la lumière solaire*. Bulletin de l'Académie royale de Belgique, 1890 et 1891.

S'il en est ainsi, si le bacille peut emprunter l'oxygène nécessaire à sa respiration aux nitrates, il doit pouvoir, en présence de ces sels, *vivre en l'absence d'oxygène libre, vivre en anaérobie.*

C'est ce que l'expérience a prouvé.

Le Bacille mycoïde ensemencé dans une solution sucrée additionnée de nitrates, en atmosphère d'hydrogène ou d'acide carbonique, s'est développé aussi bien que dans un ballon témoin où l'air avait accès. Ici encore il y a eu réduction des nitrates en nitrites et en ammoniaque, et combustion du sucre en acide carbonique et en eau. Les deux phases de cette fermentation anaérobie peuvent être représentées par les équations suivantes, dans lesquelles (CH²O) représente l'hydrate de carbone en présence.



Comme le sucre, l'albumine peut, en l'absence d'oxygène mais en présence de nitrates, être oxydée par le microbe, tandis que lorsqu'il n'existe pas dans le milieu de substance facilement réductible, la production d'ammoniaque aux dépens de l'albumine nécessite le concours de l'oxygène libre.

Un fait analogue a été signalé récemment par Giltay et Aberson (*). Ils ont isolé du sol un organisme qui, en l'absence d'oxygène dans les solutions de nitrates addi-

(*) GILTAY et ABERSON, *Recherches sur un mode de dénitrification et sur le schizomycète qui la produit.* Archives néerlandaises, t. XXV, p. 541.

tionnées d'asparagine, transforme ce corps en ammoniaque en empruntant l'oxygène nécessaire aux nitrates qu'il réduit.

19. *Action du Bacille mycoïde sur les hydrates de carbone.*—L'étude de la nutrition carbonée du Bacille mycoïde présente certaines difficultés spéciales provenant de ce fait, que ce microbe se développe très mal dans les solutions dépourvues de matières organiques azotées.

J'ai donc dû me borner à ajouter à des solutions de blanc d'œuf différents hydrates de carbone.

Dans ces conditions, la culture prend un aspect tout particulier; dès le second jour, la liqueur se trouble: la réaction est devenue acide et l'albumine s'est précipitée.

Cette production d'acide s'observe avec la glycose, la saccharose, la lactose, la dextrine et l'amidon; elle est très faible avec l'inuline et nulle avec les gommés.

Cette réaction acide n'est cependant pas définitive; sous l'influence d'une zymase sécrétée par le microbe (*), les flocons d'albumine précipitée se dissolvent peu à peu, et, par la production d'ammoniaque, la réaction devient neutre et puis enfin franchement alcaline. Ceci montre combien est peu fondée la distinction qu'ont établie certains auteurs entre les *bactéries acidifiantes* et les *bactéries alcalinisantes*. Ces variations de réaction dépendent essentiellement de la nature du milieu.

(*) Cette zymase est très probablement du groupe des trypsines; elle peut, en effet, agir en milieu alcalin et donne naissance, à côté de peptones, à de la leucine, tyrosine, etc.

CONCLUSIONS.

1. L'oxydation graduelle dans le sol de l'azote des matières organiques en nitrates ou *nitrification*, s'accomplit en trois phases principales :

A. L'*ammonisation* ou transformation de l'azote organique en ammoniacque ;

B. La *nitrosation* ou transformation de l'ammoniacque en nitrites ;

C. La *nitration* ou transformation des nitrites en nitrates.

2. L'ammonisation s'accomplit essentiellement sous l'influence des microbes divers (bactéries, levures, moisissures) qui pullulent dans les couches supérieures du sol.

Dans la terre arable, l'action des bactéries est prédominante ; dans les terres humeuses, acides, les moisissures interviennent pour une part importante dans le phénomène.

3. Parmi les bactéries du sol arable, le *Bacillus mycoïdes* ou bacille de la terre (*Erde Bacillus* des auteurs allemands) est à la fois un des plus répandus et celui dont l'action sur les matières azotées est la plus énergique.

4. Sous l'influence de ce microbe, l'oxygène se porte sur les éléments de l'albumine : le carbone est transformé en acide carbonique, le soufre en acide sulfurique, l'hydrogène partiellement en eau, laissant l'ammoniacque comme résidu de cette oxydation.

Il y a également production, en petites quantités, de peptones, leucine, tyrosine et d'acides gras odorants.

5. Les conditions optima pour l'activité du microbe ammonisant sont les suivantes :

A. Une température élevée, voisine de 30° ;

B. Une aération complète ;

C. Une légère alcalinité de milieu ;

D. Une faible concentration des solutions albumineuses.

6. Le Bacille mycoïde s'est montré apte à transformer en ammoniacque non seulement l'albumine de l'œuf, mais encore la caséine, la fibrine, la légumine, le gluten, la myosine, la sérine et les peptones.

La créatine, la leucine, la tyrosine et l'asparagine subissent les mêmes modifications ; au contraire, l'urée, le nitrate d'urée ainsi que les sels ammoniacaux ne sont pas attaqués par le microbe, pour lequel ils ne constituent pas un aliment

7. Le Bacille mycoïde, *ammonisant* et *aérobie* en présence de matières organiques azotées, devient *dénitrifiant* et *anaérobie* quand il existe dans le milieu des corps facilement réductibles (nitrates).

En l'absence de tout oxygène libre dans des solutions renfermant une matière organique (sucre, albumine), il réduit les nitrates en nitrites et en ammoniacque.

Il est donc capable de dégager de l'ammoniacque par deux processus tout à fait opposés : par oxydation dans un cas, par réduction dans l'autre.

Le présent travail a été exécuté à l'Institut botanique de Bruxelles ; c'est pour moi un devoir bien agréable de remercier ici publiquement M. le professeur Errera, ainsi que ses assistants, MM. les docteurs Clautriau et Massart, pour les précieux conseils qu'ils m'ont prodigués dans le cours de mes recherches.

BULLETINS
DE
L'ACADÉMIE ROYALE

DES
SCIENCES, DES LETTRES ET DES BEAUX-ARTS
DE BELGIQUE.

SOIXANTE-TROISIÈME ANNÉE. — 3^{me} SÉRIE, T. 25.



BRUXELLES,
F. HAYEZ, IMPRINEUR DE L'ACADÉMIE ROYALE DES SCIENCES,
DES LETTRES ET DES BEAUX-ARTS DE BELGIQUE,
rue de Louvain, 112.

1893