Étude biologique d'une bactérie du sol fixant l'azote atmosphérique. Part 2

Autor(en): **Porchet, Berthe**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **58 (1933-1935)**

Heft 233

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-272169

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.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Berthe Porchet. — Etude biologique d'une bactérie du sol fixant l'azote atmosphérique.

(*2e communication.*)

La première contribution à l'étude de cette bactérie (voir ce *Bulletin*, fascicule 232, p. 1) posait un grand nombre de problèmes, que nous avons cherché à élucider dans le présent travail :

Influence du milieu du culture sur l'évolution de la bactérie.

Les observations consignées dans la première partie de cette étude avaient été faites sur des cultures de la bactérie en milieux nutritifs synthétiques: agar de Stoklasa, dont la composition a été indiquée, et agar mannité, sans azote combiné, contenant les substances suivantes :

mannite	15 gr. $^0/_{00}$	agar	12 gr. $^0/_{00}$
KH^2PO^4	1 gr. $^0/_{00}$	eau ordinaire	

Or, nous avons constaté que l'évolution est moins complète sur les milieux suivants:

a) moût	7 %	b) bouillon de pommes de terre	
gélatine	15 %	peptone	5 $^0/_{00}$
eau ordinaire		agar	12 $^0/_{00}$

Nous n'obtenons que rarement les formes involutives géantes, la mise en liberté des gonidies, la sporulation.

De plus, sur le milieu suivant:

bouillon de Liebig	5 $^0/_{00}$	peptone	5 $^0/_{00}$
	eau ordinaire		

il ne se produit aucune évolution. Les bactéries conservent leur aspect de bâtonnets, prennent fréquemment une forme filamenteuse, mais ne subissent aucune modification morphologique.

La comparaison entre les divers milieux de culture, la substitution de l'agar à la gélatine, ou la suppression de ces substratums (milieux liquides) a permis d'établir que c'est la richesse en azote, variant d'un milieu à l'autre, qui détermine, au moins partiellement, la morphologie de l'organisme en question.

En effet, si, dans le milieu agar de Stoklasa, qui contient comme seule source d'azote combiné: 0,1 gr. de KNO^3 par litre, on remplace cette substance par 5 gr. de peptone par litre, toutes autres conditions restant semblables, on constate que l'évolution est insignifiante.

C'est probablement pour la même raison que les cultures sur milieux gélatinés sont moins évoluées que celles qui se développent sur agar, bien que les sels nutritifs servant d'aliments soient identiques dans les deux cas; la peptonisation qui se produit par la liquéfaction de la gélatine, met probablement à la disposition des bactéries de l'azote assimilable. Toutefois, si l'on n'observe pas sur milieux gélatinés la transformation complète de la culture en gonidies (fait fréquent sur agar), ni la sporulation, on y constate des formes involutives et le phénomène de morcellement précédemment décrit. Il faut une grande richesse du milieu en azote — en azote organique en particulier — (bouillon de Liebig peptoné), pour qu'aucune évolution ne se manifeste.

Sur de la terre stérilisée, la bactérie ne se développe pas. Si on humecte ce milieu par une solution de sels minéraux appropriés, au nombre desquels KNO^3, on observe la formation des gonidies et leur libération; le milieu terre ne semble pas favorable à une pullulation du microorganisme.

Souche sporulée.

Nous avons dit que le phénomène de sporulation apparaissait dans une culture et disparaissait au cours des repiquages suivants, sans que l'on puisse préciser ce qui le déterminait.

Nous avons cependant obtenu une souche sporulée, apparue comme secteur dans une colonie non sporulée. Elle présente la particularité de se reproduire régulièrement par spores. Au dixième repiquage, la sporulation se maintient très nette.

Pour éprouver la valeur du caractère « sporulé » de cette souche, nous avons repiqué sur milieu neuf des colonies âgées de 24-48 h. seulement, par conséquent ne présentant pas encore de spores, puisque celles-ci n'apparaissent qu'après quelques jours. Cette multiplication par bipartition seulement, due au transfert fréquemment répété de cultures jeunes sur milieu neuf, ne fait pas perdre à la souche en question sa faculté de sporuler.

La sporulation de cette souche ne se produit pas sur certains milieux (gélatine, bouillon peptoné). Ce fait est général et s'observe chez les bactéries sporulées. Dans le cas particulier, le passage sur ces milieux ne fait pas perdre à la souche en question son pouvoir de sporuler, car, repiquée sur agar de Stoklasa, par exemple, une colonie préalablement cultivée sur gélatine produit des spores. Dans ce cas, on peut donc considérer la faculté de sporuler non pas comme dé-

pendante de facteurs externes, mais comme un caractère fixé devenu « dominant » par un processus analogue à une mutation, tandis qu'il est instable dans d'autres souches.

Résistance des spores et des gonidies à la chaleur.

Les spores de la bactérie en question, en suspension dans de l'eau distillée soumise progressivement à la chaleur du bain-marie, supportent une température de 94° C., maintenue durant 2 minutes, mais sont tuées par 102° C. durant le même temps. La température de 102° a été produite en étuve électrique, par un phénomène de surchauffe de l'eau en tube étroit, l'évaporation étant très faible.

Les gonidies, au contraire, sont tuées en 2 minutes à 50° C., à la même température que les formes bactériennes jeunes.

Il y a là une constatation intéressante, qui donne une indication sur la nature des gonidies et constitue un nouveau fait différenciant l'un de l'autre ces deux modes de reproduction.

Cytologie.

Les observations sur la bactérie vivante ont été facilitées par l'emploi du rouge neutre à 1 ‰. Ce dernier colore la couche protoplasmique externe, que nous désignerons pour plus de commodité sous le nom de membrane. C'est grâce à cette coloration que les bactéries représentées dans la planche ci-jointe, fig. 2-9, ont pu être photographiées, à l'état vivant. Le rouge neutre à cet état de dilution ne tue pas la bactérie; des suspensions bactériennes laissées plusieurs minutes au contact du colorant se sont parfaitement développées par la suite. Il ne s'agit donc pas d'une coloration *post mortem*.

Cette coloration a permis l'observation plus précise des phénomènes suivants:

1. *Mise en liberté des gonidies.*

La libération des gonidies telle que la représente la fig. 1 de la planche ci-jointe n'est pas un processus général. Dans la plupart des cas, les gonidies sont libérées par un phénomène qui peut être interprété comme une résorption de la couche protoplasmique externe (membrane). Dans une colonie évoluée, on observe les divers stades représentés fig. 3.

a) les gonidies, incolorables, sont groupées, entourées de la membrane bactérienne colorée par le rouge neutre. Ces deux formations sont nettement distinctes et rappellent, morphologiquement, des ascospores au sein d'un asque.

La membrane peut être à contours réguliers, ou épouser

la forme des gonidies qu'elle entoure; il n'est pas exclu que ce dernier aspect corresponde à un stade succédant au premier.

b) Les gonidies sont libérées, comme le représente la fig. 2; des fragments de membrane, colorés, indiquent que cette dernière est en voie de disparition.

c) Les gonidies sont libres, réfringentes, complètement incolorables par le rouge neutre. Elles sont isolées, ou par groupes de deux ou plusieurs.

Si, à ce stade d'évolution, on repique un fragment de la colonie sur milieu nutritif neuf, on observe après 12 heures les faits suivants:

a) Les gonidies encore entourées de la membrane bactérienne ne germent pas isolément. Au contraire, la bactérie se reconstitue, les gonidies disparaissent progressivement et le plus souvent la bactérie ainsi reformée se morcelle. Nous avons observé ce fait d'une manière constante et générale, et sa réalité est incontestable, bien que théoriquement elle puisse paraître surprenante. Les fig. 4 et 6 montrent les vestiges des gonidies au sein de bactéries qui se reconstituent.

b) Les gonidies isolées, se trouvant dans le milieu comme de petits globules réfringents et incolorables, se développent sur milieu nutritif neuf en donnant chacune une bactérie. Le premier signe de leur développement est une mince couche externe colorable par le rouge neutre, qui s'étend peu à peu à toute la surface de la gonidie. Les éléments fortement colorés, fig. 5, représentent deux gonidies à ce stade d'évolution.

Il semble que cette mince couche protoplasmique externe que nous ne pouvons définir et caractériser que par sa faculté d'être colorable au rouge neutre, joue un rôle essentiel dans la biologie de la bactérie; elle contient peut-être des facteurs d'organisation.

2. *Morcellement des bactéries.*

Ce phénomène, nous l'avons noté, peut s'observer sur des éléments de tous âges. Il se présente sous la forme d'étranglements. La coloration au rouge neutre nous a permis de constater que la fragmentation est précédée de la formation d'une membrane transversale. La fig. 9 représente des formes géantes en voie de fragmentation, avec les cloisons séparant les segments bactériens.

Nous avons, d'autre part, constaté d'une façon particulièrement nette la fragmentation d'une culture jeune en éléments très petits (fig. 7 et 8), qui ont formé un secteur dans

la colonie et n'ont repris leur forme normale qu'après plusieurs repiquages.

Enfin, le fait le plus intéressant à ce sujet a été observé dans une culture sporulée. Les éléments âgés de 24-48 heures, par conséquent non encore sporulés, se morcellent; au cours des jours suivants, on constate que, dans certaines bactéries, chaque fragment produit une spore. Les microphotos 10 et 11 (matériel fixé et coloré) donnent l'image du phénomène. Cette observation complète celle que nous avons relatée précédemment: la sporulation aux deux extrémités de la bactérie.

Ces brèves observations cytologiques, ajoutées aux faits précédemment relatés, nous conduisent à la conclusion suivante :

Chaque bactérie de l'espèce étudiée contient en potentialité plusieurs bactéries (de même espèce), puisqu'elle forme en son intérieur plusieurs éléments (gonidies) capables de donner chacun une bactérie; d'autre part, par la fragmentation, qui n'est précédée d'aucune augmentation de volume, elle donne naissance à plusieurs bactéries, et parfois à plusieurs spores. On pourrait émettre l'hypothèse d'une division de la matière nucléaire au sein de la bactérie, qui ne s'accompagnerait pas d'une augmentation du volume cytoplasmique; ces fragments de noyaux agiraient comme centres d'organisation, en déterminant la formation de cellules autonomes au sein d'un élément bactérien (gonidies, formes morcelées, spores).

Fixation de l'azote.

La bactérie étudiée se développe normalement sur des milieux ne contenant pas d'azote combiné, mais des phosphates et des hydrates de carbone en abondance (glucose, mannite). Les colonies atteignent 1-2 cm. de diamètre. Sur silicogel mannité, le développement est faible, en particulier celui des souches cultivées durant longtemps sur milieux azotés.

D'une façon générale, le développement sur milieux sans azote combiné est inférieur à celui d'*Azotobacter chroococcum,* mais supérieur à celui de *B. megaterium,* par exemple. Cette bactérie doit être classée dans le groupe des faibles fixateurs d'azote, caractère qui la rapproche aussi des *B. danicus* et *malabarensis* étudiés par Löhnis.

Fréquence de la bactérie dans le sol.

Nous avons isolé du sol plusieurs souches de cette bactérie; elles ont toutes présenté les mêmes phénomènes d'évolution et les mêmes caractères. Ceux-ci ne peuvent donc pas être considérés comme tératologiques ou fortuits.

Résumé. — Conclusions générales.

La bactérie étudiée manifeste un polymorphisme intéressant. Elle se présente à l'état jeune sous forme de bâtonnets; ceux-ci, au bout de quelques heures déjà, présentent en leur intérieur des granulations réfringentes incolorables.

Dans certains cas, au bout de quelques jours, ces granulations occupent tout le contenu de la cellule. Elles sont sphériques ou ovalaires, en nombre indéterminé.

Elles sont mises en liberté soit par rupture de la membrane (peut-être phénomène de plasmoptyse), soit, ce qui est le plus fréquent, par résorption de la membrane externe, qui limite la bactérie. Dans d'autres cas, elles restent à l'intérieur de cette dernière.

Lorsqu'on repique sur milieu neuf une culture ainsi évoluée, âgée de 2-3 semaines, on observe les faits suivants:

a) Les corpuscules granulaires isolés « germent » en donnant naissance à une bactérie nouvelle. Les plus volumineux germent en plusieurs points de leur surface. Ils peuvent donc être considérés comme organes de reproduction, et, en accord avec la terminologie établie, on les nomme gonidies, désignant sous ce terme des organes de reproduction prenant naissance en grand nombre au sein d'une cellule bactérienne.

b) Lorsque ces gonidies n'ont pas été mises en liberté et sont restées enveloppées par la membrane externe de la bactérie, elles ne germent pas isolément, mais la bactérie se reconstitue et reprend son aspect normal. Ce phénomène, qui peut paraître surprenant, a été observé et vérifié dans un très grand nombre de cas.

Les observations cytologiques que nous avons pu faire à l'aide du rouge neutre 1 $^0/_{00}$ sur le matériel vivant, nous font attribuer un rôle important à la membrane externe qui limite la bactérie. Elle présente la particularité d'être colorable vitalement par le rouge neutre, tandis que les gonidies ne prennent aucune coloration. Mais lorsque ces dernières ont été mises en liberté, ont quitté la cellule dont elles proviennent et sont repiquées sur milieu neuf, le premier signe de leur développement est l'apparition d'une mince pellicule colorable par le rouge neutre. Il semble que cette couche protoplasmique externe joue un rôle important et contienne peut-être une partie des facteurs d'organisation de la cellule.

Les gonidies sont tuées par une température de 50° C. maintenue durant 2 minutes.

D'autre part, cette bactérie produit des spores présentant

les caractères des spores bactériennes normales. Elles résistent à une température de 94°, mais sont tuées en 2 minutes à 102° C.

Certaines bactéries portent une spore à chaque extrémité.

La sporulation peut apparaître dans une culture, puis disparaître au repiquage suivant, sans que l'on puisse déterminer exactement ce qui la conditionne.

Toutefois, nous avons obtenu, comme secteur dans une culture, une souche sporulée qui s'est reproduite régulièrement par spores, au cours de très nombreux repiquages. Les expériences faites ont montré que la faculté de sporuler persiste dans cette souche, même si les conditions externes (milieux de culture, repiquages de cultures jeunes) n'en permettent pas la manifestation.

Dans les cultures âgées, en particulier dans les milieux pauvres en azote, la bactérie présente souvent des formes involutives géantes.

Un dernier phénomène biologique important est le morcellement, la fragmentation des éléments bactériens, processus qui ne peut être confondu avec la bipartition normale. Il s'observe sur des éléments de tous âges, cellules très jeunes, formes involutives après repiquage. Les cas les plus typiques s'observent sur les cellules fortement évoluées, sur celles qui contiennent des gonidies non libérées. Repiquées sur milieu neuf, la bactérie normale se reconstitue, puis se fragmente, sans qu'il y ait préalablement augmentation du volume cytoplasmique.

Le fait le plus intéressant a été observé dans une culture sporulée. Les éléments, âgés d'une semaine environ, se sont morcelés en 2, 3 ou 4 fragments, restant unis les uns aux autres; chacun de ces derniers a formé ensuite une spore, de sorte que la bactérie primitive contenait jusqu'à 4 spores. C'est en raison du même fait que l'on observe souvent la sporulation aux deux extrémités d'une bactérie indivise.

Le morcellement est précédé de la formation d'une cloison transversale, colorable au rouge neutre, comme la membrane externe.

Le polymorphisme de cet organisme ne se manifeste sous tous ses aspects que dans les cultures faites sur milieux pauvres en azote combiné. Lorsque le milieu est riche en azote organique (bouillon peptoné, par exemple), il ne se produit aucune évolution; les bactéries gardent leur forme bâtonnet ou filament.

Cet organisme est un faible fixateur d'azote. Bien que se

développant normalement sur des milieux nutritifs sans azote combiné, mais riches en hydrates de carbone et en phosphate, il y pullule moins facilement qu'*Azotobacter chroococcum*.

Plusieurs souches de cet organisme ont été isolées du sol; toutes ont présenté les mêmes phénomènes biologiques.

Par sa morphologie et ses caractères de faible fixatrice d'azote libre, cette bactérie est très voisine des *B. danicus* et *B. malabarensis*, dont elle présente fréquemment les formes en fuseau.

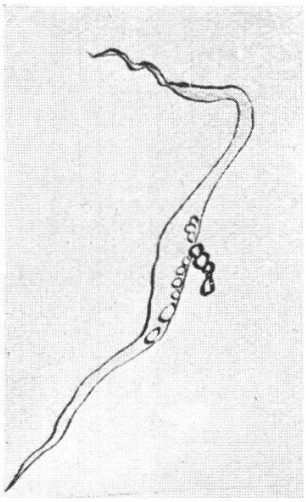
Les observations relatées dans cette étude apportent une contribution à la question du polymorphisme des bactéries, en particulier des formes filtrantes des microorganismes. Il est possible en effet que ce que l'on considère comme formes filtrantes chez certaines bactéries pathogènes soit des formations analogues aux gonidies ou aux fragments bactériens décrits dans le présent travail, mais invisibles, les dimensions des bactéries pathogènes en question étant beaucoup plus réduites que celles de l'organisme que nous venons d'étudier.

L'étude des bactéries du sol, dont la biologie n'a pas été modifiée par le parasitisme, est d'un très grand intérêt à la fois théorique et pratique; elle décèle certaines potentialités biologiques importantes, que les organismes adaptés à la vie parasitaire ont partiellement perdues.

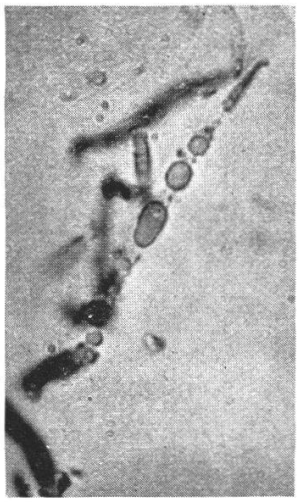
Station fédérale d'essais viticoles, Lausanne.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

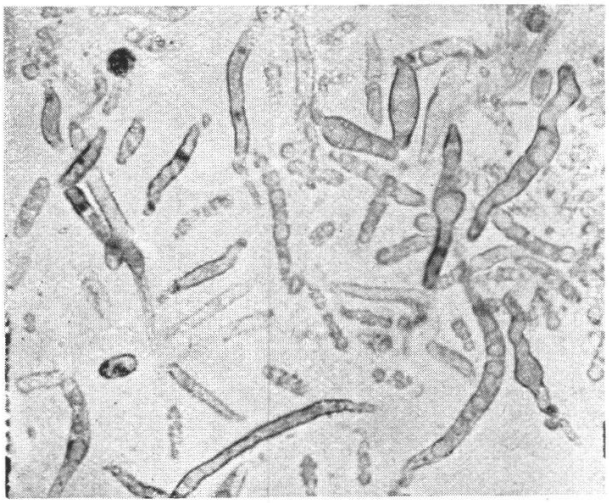
1. Mise en liberté des gonidies (cas rare), dessin.
2. Mise en liberté des gonidies, résorption de la membrane (coloration vitale au rouge neutre).
3. Gonidies au sein des bactéries; membrane colorée par le rouge neutre (coloration vitale au rouge neutre).
4. Gonidies en voie de disparition dans une bactérie qui se reconstitue (coloration vitale au rouge neutre).
5. Gonidies isolées (éléments fortement colorés) repiquées sur milieu neuf (coloration vitale au rouge neutre).
6. Comme 4.
7. Morcellement d'éléments jeunes (coloration vitale au rouge neutre).
8. Eléments bactériens après morcellement (coloration vitale au rouge neutre).
9. Segmentation précédée de la formation de cloisons transversales, colorées par le rouge neutre.
10. Bactéries en fragmentation; chaque fragment porte une spore (coloration à la fuchsine de Ziehl à chaud après fixation).
11. Comme 10.



1

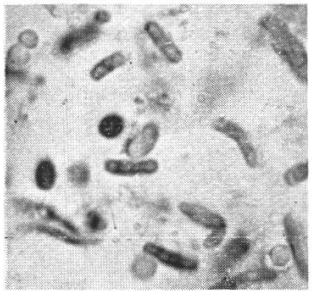


2

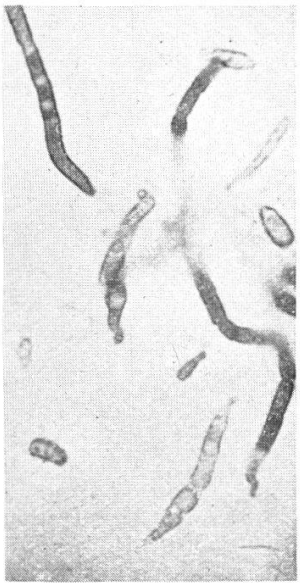


3

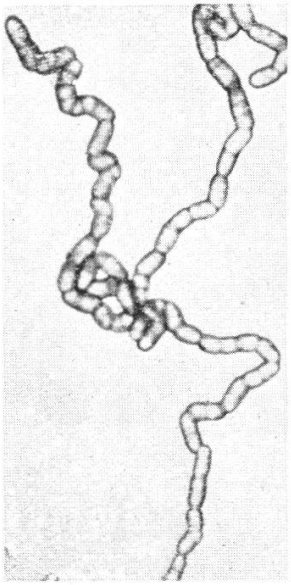
4



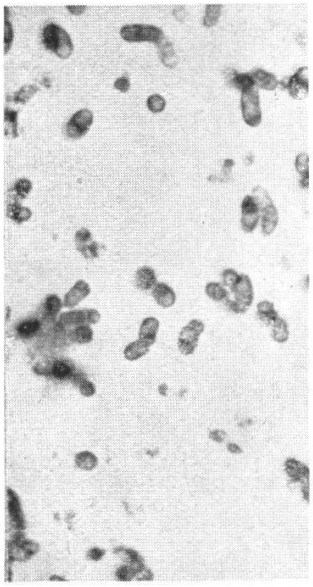
5



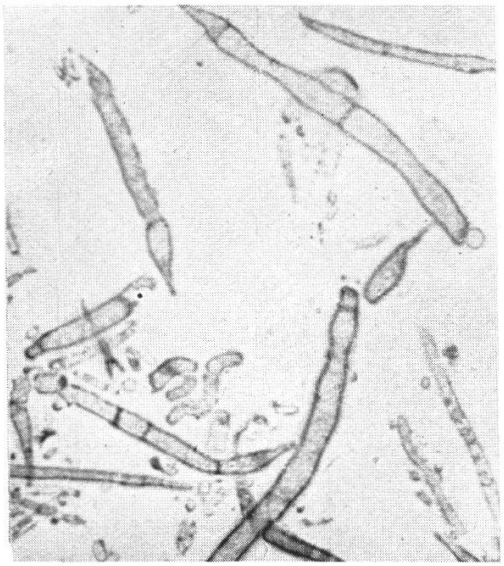
6



7



8



9

10

11