

Bibliothèque numérique

medic@

**Lutz, Louis. - Les microorganismes
fixateurs d'azote (morphologie et
biologie). Thèse présentée au
concours d'agrégation (Section
d'histoire naturelle et de pharmacie).**

1904.

***Coulommiers : impr. Paul
Brodard***

Cote : P30908



(c) Bibliothèque interuniversitaire de santé (Paris)
Adresse permanente : [http://www.biusante.parisdescartes
.fr/histmed/medica/cote?pharma_p30908x1904x16](http://www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/medica/cote?pharma_p30908x1904x16)

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS (1904) 16

THÈSE

PRÉSENTÉE AU CONCOURS D'AGRÉGATION
du 16 Avril 1904

SECTION D'HISTOIRE NATURELLE ET PHARMACIE

LES MICROORGANISMES FIXATEURS D'AZOTE

(MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE)

PAR

LOUIS LUTZ

Docteur en sciences naturelles

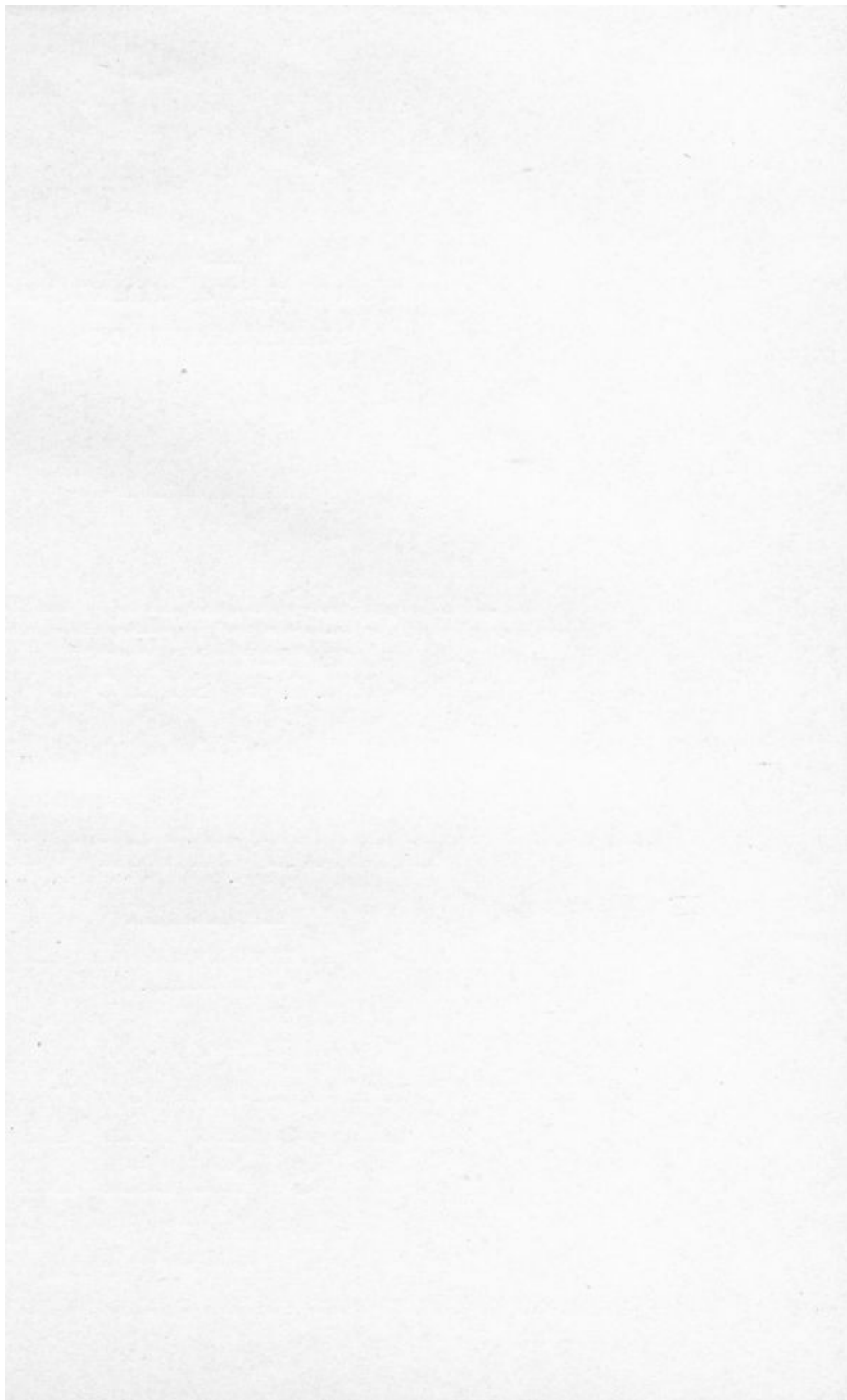
Chef des travaux micrographiques à l'École supérieure de Pharmacie de Paris
Professeur suppléant à l'École nationale supérieure d'Agriculture coloniale



COULOMMIERS

IMPRIMERIE PAUL BRODARD

1904







ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS

THÈSE

PRÉSENTÉE AU CONCOURS D'AGRÉGATION

du 16 Avril 1904

SECTION D'HISTOIRE NATURELLE ET PHARMACIE

LES MICROORGANISMES FIXATEURS D'AZOTE

(MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE)

PAR

LOUIS LUTZ

Docteur ès sciences naturelles

Chef des travaux micrographiques à l'École supérieure de Pharmacie de Paris

Professeur suppléant à l'École nationale supérieure d'Agriculture coloniale



COULOMMIERS

IMPRIMERIE PAUL BRODARD

1904

JUGES DU CONCOURS

MM. GUIGNARD, *Président*.
PRUNIER.
BOURQUELOT.
RADAIS.
COUTIÈRE.
PERROT.
JADIN.

JUGES SUPPLÉANTS

MM. GRIMBERT.
OUVRARD.
LEBEAU.
MOUREU.

SECRÉTAIRE

M. MUSSON.

CANDIDAT

MM. ASTRUC.
GAUCHER.
GUÉGUEN.
GUÉRIN.
LUTZ.

INTRODUCTION



Peu de phénomènes ont passionné les physiologistes à un plus haut degré que la fixation de l'azote atmosphérique sur le sol nu ou cultivé. C'est qu'à l'attrait qui s'attache toujours à un problème scientifique ardu, se joignaient des considérations dont l'agriculture et, par suite, la richesse publique devaient profiter dans la plus large mesure.

Posée il y a trois quarts de siècle par les mémorables travaux de BOUSSINGAULT et de G. VILLE, cette question a été l'objet, depuis vingt-cinq ans environ, d'un nombre très considérable de publications, bien souvent contradictoires, desquelles cependant la vérité a fini par se dégager sous une forme qui n'est probablement pas définitive, mais qui comporte déjà les plus précieux enseignements.

Il nous a paru qu'au jour où la fixation de l'azote avec le concours des microorganismes ne faisait plus de doute pour personne, alors que tous les efforts allaient tendre à préciser le mécanisme du phénomène et à rechercher de nouveaux êtres microscopiques capables d'y jouer un rôle actif, il pouvait être de quelque intérêt de jeter un

regard en arrière et de synthétiser en quelque sorte les résultats obtenus.

Mais, pour conserver une clarté suffisante à cet exposé, nous avons dû restreindre le nombre des mémoires originaux auxquels nous étions appelé à faire des emprunts et c'est ce qui nous a conduit à adopter pour la bibliographie une disposition spéciale. Les indications nécessaires pour l'intelligence du texte seront citées en renvois au bas des pages et, d'autre part, un index beaucoup plus étendu figurera à la fin de l'ouvrage et contiendra une énumération aussi complète que possible de la généralité des travaux.

La même raison expliquera une anomalie apparente dans la disposition des chapitres : alors que l'étude de la fixation de l'azote par les microorganismes du sol a été séparée nettement de la fixation par les associations symbiotiques d'un végétal et d'une Bactérie, les deux phénomènes sont réunis dans la partie historique. C'est que les premiers résultats expérimentaux révèlent des incohérences dues à ce qu'on ne connaissait pas la cause essentielle mise en jeu. Les observations du début confondaient tout ensemble le sol, les végétaux supérieurs, voire plus tard les organismes unicellulaires, de telle sorte qu'en essayant de séparer ces multiples phénomènes, on eût abouti à des incohérences plus grandes encore.

Enfin, nous tenons à bien préciser que notre but a été l'étude de la fixation d'azote en elle-même, sans nous inquiéter aucunement des modifications ultérieures subies par cet élément une fois fixé, c'est-à-dire de la nitrification, de la fermentation ammoniacale, de la dénitrification, pas plus d'ailleurs que de la simplification molécu-

laire de certaines matières azotées très complexes sous l'influence d'actions microbiennes qui les transforment peu à peu en substances directement assimilables par les végétaux supérieurs, ou en composés nitrifiables. Et si le mot nitrification se rencontre parfois dans le cours de ce travail, c'est que la production d'azote nitrique est si fréquemment corrélative de la fixation, que beaucoup d'auteurs ne séparent nullement les deux ordres de faits et que leurs observations se rapportent également bien à l'un et l'autre phénomène.

Maintenue dans ces limites en apparence étroites, la question dont nous nous sommes proposé l'étude reste néanmoins très vaste, par suite de la diversité des actions mises en jeu. Nous nous bornerons donc à signaler sans trop y insister les applications agricoles basées sur la connaissance des Microbes fixateurs d'azote, pour envisager d'une manière plus complète la morphologie et la biologie de ces organismes.

Ce travail sera divisé en 9 chapitres :

- I. — Historique de la fixation de l'azote gazeux de l'atmosphère par le sol et les végétaux.
- II. — Essais de culture des microorganismes fixateurs de l'azote atmosphérique sur le sol.
- III. — Fixation de l'azote par l'intermédiaire de l'alinite.
- IV. — Conditions générales de la fixation directe de l'azote par le sol.
- V. — Morphologie et physiologie des tubercules radicaux des Légumineuses et des organismes qu'ils renferment.
- VI. — Premières applications à la grande culture des travaux relatifs aux Bactéries des Légumineuses.
- VII. — Essais d'inoculation des sols avec des cultures pures du Microbe des Légumineuses. — Nitragine.
- VIII. — Des nodosités qui se rencontrent sur les racines de plantes

appartenant à des familles autres que celle des Légumineuses.

IX. — Assimilation de l'azote par les Algues vivant en symbiose avec certaines Bactéries. — Les Mousses microscopiques sont-elles capables de fixer l'azote atmosphérique? — Les Moisissures considérées comme agents de fixation.

Les figures intercalées dans le texte sont reproduites d'après divers mémoires originaux; elles sont dues à l'habile crayon de M. BONARD, préparateur-dessinateur à l'École supérieure de Pharmacie de Paris, à qui nous sommes heureux d'exprimer nos amicaux remerciements.

LES
MICROORGANISMES FIXATEURS D'AZOTE
(Morphologie et Biologie)

CHAPITRE I

*Historique de la fixation de l'Azote gazeux
de l'atmosphère
par le sol et par les végétaux.*

Les anciens Romains connaissaient déjà la propriété des Légumineuses d'enrichir le sol en éléments nutritifs. PLIN¹, dans son *Histoire naturelle*, écrit à propos du Lupin ces phrases caractéristiques :

« Lupinus est usus proximus... Pinguescere hoc satu arva vineasque diximus. Itaque adeo non eget fimo, ut optimi vicem repraesentet. »

Il en est de même de la pratique des cultures dérobées qui est mentionnée avec détails quelques lignes plus loin :

« Ex densiore terra rubricam maxime amat (Le Lupin). Ad hanc alendam post tertium florem verti debet, in sabulo post secundum ».

Néanmoins les premiers travaux scientifiques relatifs aux rapports de la plante et de l'azote atmosphérique suivirent seulement de près la connaissance de la composition de l'air.

PRIESTLEY² crut reconnaître qu'un pied de Menthe, placé en vase clos, dans une atmosphère d'air ordinaire, absorbe en un mois la moitié du gaz en présence. INGEN-HOUZ³ généralisa

1. PLINIUS, *Naturalis historiae*, Lib. XVIII, § xxxiv, 2.

2. PRIESTLEY, *Expériences sur l'air*, t. IV, p. 5, sect. xxxii, p. 371, 1780.

3. INGEN-HOUZ, *Expériences sur les végétaux*, t. I, sect. xx, p. 86, Paris, 1787.

cette observation en avançant, sans d'ailleurs en donner de preuve bien nette, que tous les végétaux sont susceptibles d'assimiler l'azote gazeux.

DE SAUSSURE¹ reprit les recherches de PRIESTLEY. Les mesures auxquelles il se livre le conduisent à conclure à la non-absorption de l'azote gazeux qui n'interviendrait que comme élément inerte, destiné à tempérer les affinités de l'oxygène. La nutrition azotée se ferait aux dépens de l'ammoniaque de l'air.

BOUSSINGAULT² utilisa des méthodes plus précises. Il cultivait des plantes dans du sable calciné arrosé d'eau distillée, redistillée sur de la chaux pour enlever toute trace d'ammoniaque; on dosait avant l'expérience l'azote des graines, puis, à la fin de la végétation, l'azote du sol et des plantes. Les premiers essais, exécutés avec du Trèfle et du Froment, montrèrent que, pendant la germination, les plantes n'éprouvent aucune variation sensible dans la quantité d'azote qu'elles contiennent. Il n'en est plus de même au bout de quelque temps : le Trèfle accuse une augmentation de son azote, tandis que rien de semblable n'a lieu pour le Blé.

Voulant se mettre à l'abri des causes d'erreur dues à l'apport possible des poussières atmosphériques, BOUSSINGAULT refit la même expérience sous une cloche traversée par un courant d'air ayant barboté dans l'eau; il obtint des résultats analogues.

Peu après³, il remarqua que le Pois se conduit comme le Trèfle et même arrive à fleurir et à fructifier dans un sol constitué uniquement par du sable calciné. Il chercha également quel peut être l'effet d'une transplantation sur la marche de la végétation. Il préleva dans un bon sol des pieds de Trèfle et de Blé qu'il transporta dans de la ponce calcinée disposée sous une cloche. Or le Trèfle, après quelques jours, se remit à pousser vigoureusement et bientôt il fleurit. Pendant ce temps, le Blé languissait et ne tardait pas à périr.

1. DE SAUSSURE, Recherches chimiques sur la végétation, 1804, p. 206.

2. BOUSSINGAULT, Recherches chimiques sur les végétations, *Ann. Ch. et Ph.*, 2^e s., t. LXVII, 1838, p. 5.

3. BOUSSINGAULT, Recherches chimiques sur les végétations (2^e mémoire), *Ann. Ch. et Ph.*, 2^e s., t. LXIX, 1838, p. 353.

Douze ans après (1851), BOUSSINGAULT¹ reprit ses expériences et arriva à des résultats contraires. Il disposa ses plantes dans une atmosphère non renouvelée, sous une cloche de 35 litres à fermeture hydraulique (au moyen d'eau acidulée placée dans une soucoupe). Les graines furent semées dans de la ponce calcinée au préalable dans un creuset percé d'un trou et qui servira de pot après refroidissement. Cette ponce était additionnée de cendres de fumier. D'autres essais semblables eurent lieu dans de grands ballons de 70-80 litres. Tous les résultats concordèrent entre eux et BOUSSINGAULT formula cette conclusion que les plantes ne fixent pas d'azote. Bien plus, le poids de la matière sèche des plantes était moindre que celui des graines, tandis que, dans le cas d'une végétation normale, ce poids est très notablement supérieur. La non-assimilation de l'azote libre semblait ainsi démontrée.

Une opinion analogue fut émise la même année par MÈNE² qui, en cultivant des plantes dans du verre pilé arrosé d'eau distillée, avait cru remarquer une augmentation d'azote, mais qui avait également observé que, dans un sol contenant du nitrate d'ammoniaque, cette substance diminuait au cours de la végétation tandis que l'azote de l'atmosphère ne subissait aucune variation.

Vers la même époque, G. VILLE³ publie plusieurs Mémoires qui conduisent à des conclusions contraires. Il se demande si l'ammoniaque de l'air est suffisante pour fournir aux plantes l'azote qui leur est nécessaire, ou bien s'il y a parallèlement une fixation d'azote gazeux. Il sème du Cresson, du Lupin, du Colza, du Blé, du Seigle et du Maïs dans de la ponce calcinée, additionnée des cendres fournies par la plante à cultiver, et placée sous des cloches dans lesquelles on fait circuler de l'air naturel ou privé de son ammoniaque par passage sur de la ponce sulfurique. Dans le premier cas, l'ammoniaque était

1. BOUSSINGAULT, *Agronomie, Chimie agricole et Physiologie*, t. II, 1860, p. 1. — Voir aussi : *Recherches sur la végétation, Ann. Ch. et Ph.*, 3^e s., t. XLI, 1854, p. 5; id., t. XLIII, 1855, p. 149.

2. MÈNE, *Expériences sur l'influence de l'azote sur la végétation, C. R.*, t. XXXII, 1851, p. 180.

3. G. VILLE, *Recherches sur les végétations, C. R.*, t. XXXI, 1850, p. 578; t. XXXV, 1852, p. 464, 650; t. XXXVIII, 1854, p. 705, 723.

soigneusement dosée dans l'air en expérience. Or, avec toutes les plantes, il y eut fixation d'azote et, cependant, la quantité d'ammoniaque qui avait traversé les cloches était insuffisante pour rendre compte de l'augmentation constatée. Celle-ci était donc le fait de l'intervention de l'azote atmosphérique, bien que l'ammoniaque ait pu agir de son côté d'une manière favorable. D'autres essais poursuivis avec le Soleil et le Tabac conduisirent VILLE à une conclusion analogue.

Ces expériences furent répétées en 1855 par une Commission de l'Académie des Sciences, et le Rapport publié à cet égard par CHEVREUL¹ constate une concordance absolue avec les résultats obtenus par VILLE.

Les conclusions de G. VILLE et de BOUSSINGAULT sont, on le voit, fort contradictoires. Aussi LAWES, GILBERT et PUGH² reprirent-ils de 1857 à 1859 les essais de chacun d'eux en se conformant à leurs indications. La terre ou la ponce employées avaient été préalablement calcinées, lavées, calcinées de nouveau et enfin refroidies sur de l'acide sulfurique. Les pots étaient placés sous des cloches à fermeture par le mercure, recevant de l'air purifié par passage sur de l'acide sulfurique et du carbonate de soude. A l'autre extrémité de l'appareil se trouvait un second barboteur à acide sulfurique destiné à prévenir tout retour de gaz. Les nombreuses graines qui germèrent se développèrent toutes jusqu'à un certain point et les plantes les plus récentes, au fur et à mesure de leur germination, absorbaient les principes azotés des plus anciennes déjà en voie de décomposition. Toutefois les Légumineuses périrent peu après leur germination, car elles ne pouvaient végéter que si elles avaient reçu une certaine quantité d'azote combiné.

Nous ne nous appesantirons pas sur la description détaillée des essais de LAWES, GILBERT et PUGH qui est donnée tout au long dans les *Philosophical Transactions* de 1861; nous rapporterons seulement les conclusions qui ont été posées par les auteurs eux-mêmes dans les termes suivants :

1. CHEVREUL, Rapport, *C. R.*, t. XLI, 1855, p. 757.

2. LAWES, GILBERT et PUGH, On the sources of the nitrogen of vegetation, *Phil. Trans.*, part. II, 1861, p. 431. — *Id.*, *Proceed. Roy. Soc. Lond.*, 1860, p. 544. — *Jnal Chem. Soc.*, 2^e s., t. I, 1863.

« Le rendement en azote des plantes de culture récoltées sur une surface et dans un temps déterminés ne peut s'expliquer d'une manière satisfaisante si l'on ne tient compte que de l'azote combiné fourni périodiquement et en quantités connues, et cela surtout dans le cas des Légumineuses.

« Les résultats des nombreuses expériences faites pour savoir si les plantes assimilent l'azote libre sont très contradictoires. Dans leurs expériences personnelles, les auteurs ont reconnu que les conditions de végétation obtenues dans leur appareil concordent avec le développement régulier des céréales, mais qu'il n'en est pas tout à fait de même pour les Légumineuses.

« Dans les conditions expérimentales réalisées, il n'est pas probable qu'une perte d'azote se soit produite par suite du dégagement d'azote libre dans la décomposition de la matière organique ou des substances azotées constituant les plantes en végétation.

« En exécutant de nombreuses expériences sur les Graminées et en faisant varier les conditions de l'expérience, il n'a jamais été reconnu d'assimilation d'azote libre.

« Dans les essais sur les Légumineuses, les résultats furent moins satisfaisants, mais ils n'ont jamais indiqué d'assimilation d'azote libre.

« Les données recueillies avec d'autres plantes s'accordent toutes au point de vue de la non fixation de l'azote libre. »

Ces conclusions sont conformes à celles de BOUSSINGAULT. Aussi la majeure partie des physiologistes se rangèrent à cette manière de voir et n'admirent la fixation directe de l'azote ni par le sol ni par les plantes.

Une semblable opinion avait d'ailleurs été émise peu auparavant par HARTING¹ qui supposait que l'azote de l'air contribue à la formation des sels ammoniacaux et des nitrates dans le sol et, par conséquent, d'une façon indirecte à la nutrition des plantes, mais que rien ne prouve son intervention directe.

VIALA² niait de même cette fixation directe.

1. HARTING, Recherches concernant l'assimilation de l'azote de l'air par les végétaux, *C. R.*, t. XLI, 1855, p. 942.

2. VIALA, Mémoire sur le rôle de l'azote dans l'alimentation des plantes, *C. R.*, t. XLIX, 1859, p. 172.

Cependant, les expériences de BOUSSINGAULT avaient orienté les recherches dans une voie nouvelle. Renonçant à envisager la cause de fixation dans les plantes elles-mêmes, de nombreux auteurs se demandèrent si le sol n'était pas susceptible, dans certaines conditions, d'être le siège de semblables phénomènes.

HERMANN¹ avait déjà prétendu, en 1844, que la fixation de l'azote avait lieu sur le bois qui se putréfie. Il plaçait du bois, en partie frais, et en partie putréfié au-dessus d'une cuvette de mercure, dans de l'air confiné, dont la composition avait été déterminée volumétriquement. Le bois frais, commençant à pourrir, absorba 1 volume d'azote et 2 volumes d'oxygène et donna en échange 4 volumes d'acide carbonique, tandis que le bois dont la putréfaction était plus avancée absorba 3,5 volumes d'azote et 27,8 volumes d'oxygène et donna en échange 27 volumes d'un composé azoté organique qui se transformait progressivement en ammoniacque à mesure que la pourriture s'accroissait.

MULDER² ayant planté des Haricots dans un sol composé d'acide ulmique trouva que les plantes avaient fixé, au cours de la végétation, 2 à 3 fois la quantité d'azote contenue dans les graines. Il supposait que le gain était dû à la formation d'ammoniacque, la combinaison de l'azote de l'air avec l'hydrogène naissant étant le fait de la décomposition de la matière organique.

Les gains d'azote observés dans le sol ont encore été attribués souvent à une véritable synthèse de l'acide azotique. C'est ainsi que MAYER³ adopte l'opinion de SCHÖNBEIN qui pensait que la vaporisation de l'eau produite par la plante était une source d'azote combiné. Mais ZABELIN⁴ a reconnu que la simple évaporation de l'eau dans l'air ne produit pas de nitrite d'ammoniacque, bien qu'il s'en forme en quantité notable en présence de cellulose ou d'autres composés organiques voisins.

1. HERMANN, Untersuchungen über die Fäulniß des Holzes, *Jnal f. prakt. Ch.*, t. XXVII, 1842, p. 165.

2. MULDER, *Chem. of animals and vegetable physiology*, p. 673.

3. MAYER, *Agriculturchemie*, p. 180.

4. ZABELIN, Ueber die Bildung von salpetrigsaurem Ammoniak aus Wasser und Stickstoff, *Ann. Ch. Pharm.*, t. CXXX, 1864, p. 54.

D'autre part, DEHÉRAIN¹ constate l'absorption d'azote gazeux par les matières organiques, lors de leur oxydation. Cette fixation est importante à 100°, mais elle se produit également à froid, bien qu'en moindre proportion.

Cette manière de voir est confirmée par TRUCHOT² qui admet que la quantité d'azote contenue dans les sols est en rapport direct avec la proportion de carbone des composés ulmiques de ces mêmes sols et qu'il y a lieu de penser avec DEHÉRAIN que l'azote atmosphérique se fixe sur ces matières avant de concourir à la nutrition des plantes.

SIMON³ trouve de même que, si l'on réunit dans un vase clos en verre du gaz azote pur et de l'acide humique dissous dans l'eau distillée, le volume de l'azote se trouve diminué au bout de quelques jours et le liquide renferme de l'ammoniaque. Il en conclut à la propriété absorbante de l'acide humique.

Ces résultats sont contestés par PAGEL⁴ qui trouve que la tourbe absorbe bien l'oxygène, mais pas du tout l'azote.

La théorie de DEHÉRAIN est encore combattue par WOLF⁵. Cet auteur, ayant enfermé dans des vases clos de l'air atmosphérique et de la terre, les a maintenus en contact pendant des temps variables sans jamais observer de fixation d'azote sur le sol.

Elle est également combattue par SCHLÆSING⁶ qui n'a obtenu aucune fixation en laissant des matières sucrées (glucose) ou du terreau en contact avec un alcali dans un ballon fermé.

Cependant, BRETSCHNEIDER⁷ se demande si la terre, ou mieux certaines substances qui s'y trouvent toujours, ont le pouvoir de fixer l'ammoniaque sans le secours de la pluie. Il expose à l'air un mélange d'ulmine (préparée en partant du sucre) et de

1. DEHÉRAIN, Sur l'intervention de l'azote atmosphérique dans la végétation, *C. R.*, t. LXXIII, 1871, p. 1352.

2. TRUCHOT, Sur la fixation de l'azote atmosphérique dans les sols, *C. R.*, t. LXXXI, 1875, p. 945.

3. SIMON, Zusammensetzung der natürlichen Humussäure, *Landw. Versuchsst.*, t. XVIII, 1875, p. 452.

4. PAGEL, Moorcultur, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 351.

5. WOLF, Naturwissenschaftliche Untersuchungen einiger Ackererden Sachsens, *Landw. Jahrb.*, t. II, 1873, p. 373.

6. SCHLÆSING, Sur la fixation de l'azote atmosphérique par la terre végétale, *C. R.*, t. LXXXII, 1876, p. 1202.

7. BRETSCHNEIDER, Bemerkungen, *Landw. Jahrb.*, t. IV, 1875, p. 393.

sable pur et il l'arrose de temps en temps avec de l'eau rigoureusement purifiée. Il constate une absorption d'azote variant de 1,3 à 5 p. 100 et cette proportion augmente plus rapidement que la quantité d'ulmine qu'on mêle avec un poids déterminé de sable. Il ne précise pas d'ailleurs la forme sous laquelle l'azote est absorbé.

Il constate enfin que l'oxyde de fer pur, le carbonate et le sulfate de chaux, la silice pure et des zéolithes artificielles absorbent l'azote de l'atmosphère, mais en quantités très différentes, les matières organiques et l'oxyde de fer étant les agents les plus actifs de fixation.

DEHÉRAIN¹, interprétant le travail de BRETSCHNEIDER, pense qu'il faut aller plus loin que lui et attribuer le gain d'azote à une fixation directe de ce gaz sur le sol.

De son côté, ARMSBY² opère sur des matières organiques azotées dont la teneur en azote a été rigoureusement déterminée et qu'il abandonne à la décomposition spontanée. Deux séries d'expériences furent instituées, la première dans l'air soigneusement purifié, la seconde dans de l'azote extrait de l'air au moyen du phosphore, mais contenant encore des traces d'oxygène. La matière organique était du fumier desséché et mélangé intimement au 1/4 de son poids de viande desséchée et pulvérisée. Ce mélange renfermait 2,11 p. 100 d'eau. Il était employé à l'état pur ou après addition des matières inorganiques suivantes rigoureusement privées d'ammoniaque : potasse, gypse, gypse et potasse. Les appareils furent exposés à la lumière diffuse pendant environ deux mois. On remarqua alors que, dans tous les cas sauf deux, il y avait perte d'azote et que cette perte était plus forte dans la première série d'expériences où la décomposition avait lieu en présence d'un excès d'oxygène. Ces résultats concordent avec ceux de LAWES, GILBERT et PUGH; ils montrent que cette perte d'azote à l'état gazeux est due à un phénomène d'oxydation. L'effet du plâtre semble la retarder partiellement. En présence de potasse, il

1. DEHÉRAIN, Observations sur le mémoire de M. BRETSCHNEIDER, *Ann. agr.*, t. II, 1876, p. 630.

2. ARMSBY, L'azote du sol, *Procced. of the Amer. Ass. f. the Adv. of Sc.*, 1874. Résumé dans *Ann. agr.*, t. II, 1876, p. 141.

y a fixation d'azote, mais ce phénomène est plus marqué en l'absence d'oxygène. Ces dernières observations sont d'accord avec celles de DEHÉRAIN et amènent ARMSBY à conclure que quelques matières organiques mêlées aux alcalis ont la propriété de se combiner à l'azote libre de l'atmosphère sans que les nitrates soient les intermédiaires de cette fixation.

Vers la même époque, BOUSSINGAULT¹, à la demande de GILBERT, résume, dans une lettre du 18 mai 1876, son opinion sur l'assimilation de l'azote libre par les plantes. Nous ne retiendrons ici que la dernière de ses remarques : « Dans les cultures des champs, en employant le fumier aux doses ordinaires, l'analyse indique qu'il y a dans les récoltes plus d'azote que n'en contenaient les engrais incorporés. »

En 1878 et 1879, HUNEFELD, REICHARDT et HERTZ^{2 et 3} prétendent qu'on obtient de l'acide nitrique par le passage d'un courant d'air sur un mélange de carbonate de magnésie et de pyrolusite ou simplement sur de la magnésie, mais GRETE⁴ fait aussitôt remarquer qu'il s'agit d'une interprétation fautive due à l'impureté des produits employés.

DEHÉRAIN⁵ met de nouveau, en 1882, le phénomène de l'enrichissement des sols sous la dépendance des matières organiques qui s'y trouvent.

La fixation directe de l'azote atmosphérique a été encore affirmée par quelques auteurs parmi lesquels on peut citer A. GAUTIER et DROUIN⁶.

Ces derniers expérimentateurs établissent, dans une longue série de mémoires, que la fixation de l'azote sur le sol est subordonnée à la présence de matières organiques, telles que l'humus, qui en sont l'intermédiaire indispensable. Les oxydes de fer accélèrent le phénomène, mais ne sont pas absolument

1. BOUSSINGAULT, Lettre à GILBERT, 18 mai 1876.

2. HUNEFELD, REICHARDT et HERTZ, Mittel zur Bildung der Salpetersäure im Boden, *Biedermann's Centralbl. f. Agriculturch.*, t. VIII, 1879, p. 327.

3. REICHARDT, *Nachrichten aus dem Club der Landw. zu Berlin*, 1878, p. 460.

4. GRETE, (sans titre), *Ber. d. d. Chem. Ges.*, t. XII, 1879, p. 674.

5. DEHÉRAIN, Des pertes et des gains d'azote que subit la terre arable sous l'influence de diverses cultures, *Ann. agr.*, t. VIII, 1882, p. 321.

6. A. GAUTIER et DROUIN, Recherches sur la fixation de l'azote dans le sol, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 754, 863, 985, 1098, 1232 et 1605; *Id.*, t. CXIII, 1891, p. 820.

nécessaires; la perméabilité, la division et le tassement des terres jouent un rôle considérable.

La quantité d'azote assimilée par les sols nus, en trois mois, a été, dans les expériences de GAUTIER et DROUIN, décuple de la quantité d'azote ammoniacal absorbée par une même surface d'eau acidulée, placée en plein air dans les mêmes conditions. Il faut donc conclure, contrairement à l'opinion de SCHLÆSING, que l'apport d'azote ammoniacal atmosphérique ne suffit pas pour expliquer ces gains. De plus, l'intervention de végétaux (Fèves) a doublé la proportion d'azote fixé (sol et récolte), indication indirecte de la part qui revient dans cette fixation aux phénomènes de la végétation.

Une autre source de fixation d'azote sur le sol a été cherchée par BERTHELOT¹ dans l'action de l'effluve électrique. L'étude de ce phénomène, d'ailleurs très limité, nous entraînerait hors du cadre de ce travail; nous n'en parlerons donc que pour mémoire.

Pendant ce temps, quelques essais timides étaient tentés de nouveau avec les plantes.

LAWES et GILBERT², s'appuyant sur des expériences de grande culture dans lesquelles des Graminées et des Légumineuses étaient maintenues avec ou sans engrais sur les mêmes sols, admettent que s'il n'y a pas de preuve absolue que l'origine de tout l'azote des plantes cultivées soit le sol lui-même, on doit fortement présumer que la plus grande partie, sinon la totalité de cet azote en provient.

Cependant leurs expériences présentent bien des points obscurs, notamment en ce qui concerne les Légumineuses pour lesquelles l'addition d'engrais potassés a porté la teneur en azote à 68 kg. 9 par hectare au lieu de 59 kg. 8 sur la terre sans engrais, alors qu'avec les Graminées, une semblable

1. BERTHELOT, Sur la fixation de l'azote libre au moyen de l'effluve électrique, *C. R.*, t. LXXXIII, 1876, p. 676; t. LXXXV, 1877, p. 173. — Id., *Ann. Ch. et Ph.*, 5^e s., t. X, 1877, p. 51; t. XII, 1877, p. 453.

2. LAWES et GILBERT, Recherche de l'azote dans quelques-uns des champs d'expériences de Rothamsted, *Meet. Amer. Ass. f. Adv. of Sc.*, Montréal, 1882, trad. dans *Ann. agr.*, t. IX, 1883, p. 393 et 451.

addition n'augmentait que très médiocrement la moyenne de l'azote. Il en est de même de cette constatation que les Légumineuses, qui réclament beaucoup plus d'azote d'une surface donnée que les Graminées, bénéficient très peu de l'emploi des engrais azotés, tandis que ceux-ci ont un effet très marqué sur l'accroissement de récolte de ces dernières plantes.

DIETZELL¹, au cours d'expériences sur certaines Légumineuses (Trèfle et Pois), développées dans des conditions aussi normales que possible dans de la terre de jardin riche en azote, formule cette conclusion que les plantes n'absorbent pas l'azote combiné de l'atmosphère.

Enfin ATWATER² cultive à l'air libre, mais à l'abri de la pluie, des Pois dans du sable calciné arrosé avec une solution nutritive parfaitement connue. Pendant deux années consécutives, il a toujours constaté dans les plantes mûres une quantité d'azote supérieure à celle qui était contenue dans la semence et les engrais. L'excès, faible quand les plantes s'étaient mal développées, atteignait son maximum lorsque la végétation s'était produite dans des conditions normales. La proportion d'azote ainsi acquise aux dépens de l'atmosphère paraît croître avec la somme de matières nutritives que l'on donne aux jeunes plantes et même, l'aliment minéral restant invariable, avec la quantité d'azote que l'on ajoute à l'engrais. Dans quatre expériences, conduites dans les conditions qui ont semblé les plus avantageuses, les plantes ont pris à l'atmosphère $1/3$ à $1/2$ de leur azote total, suivant que les dissolutions nutritives étaient pauvres ou riches en principes assimilables. ATWATER, sans se prononcer sur la forme sous laquelle la plante a pu fixer un excès d'azote aussi considérable, incline à voir dans ce phénomène l'intervention de l'azote libre dont la combinaison est peut-être facilitée par l'électricité atmosphérique jouant le même rôle que l'effluve dans les expériences de BERTHELOT.

Ces expériences d'ATWATER concordent bien avec les essais

1. DIETZELL, Vegetationsversuche über die Frage, ob die Klee und Erbsenpflanzen durch ihre oberirdischen Organe gebundenen Stickstoff aus Atmosphäre aufnehmen, *Vers. d. Naturfors. zu Magdeburg*, 1884; *Id.*, *Bot. Centralbl.*, t. XX, 1884, p. 157.

2. ATWATER, On the acquisition of atmospheric nitrogen by plants, *Amer. chem. Jnal*, t. VI, 1884-85, p. 365.

pratiques réalisés à Lupitz par SCHULTZ¹, qui, après avoir consacré pendant un certain nombre d'années de grandes surfaces de terrains pauvres à la culture de diverses Légumineuses après addition de kaïnite et d'engrais phosphatés, a constaté un enrichissement du sol, à condition toutefois de varier les Légumineuses. SCHULTZ a donné de ces expériences l'explication suivante : il divise les plantes en collectrices d'azote et consommatrices d'azote ; les premières, parmi lesquelles il range les Légumineuses, peuvent, d'après lui, prendre l'azote qui leur est nécessaire à des sources où les autres ne peuvent pas puiser, à savoir le sous-sol (au moyen de leurs racines profondes) et l'air (par l'intermédiaire de leurs feuilles). Les consommatrices, qui sont principalement représentées par les céréales, n'ont pas cette aptitude et pourront seulement se nourrir si les collectrices laissent dans le sol de la matière azotée sous forme de résidus de végétation. Les observations de SCHULTZ ne suffisent pas d'ailleurs à donner une base solide à une pareille théorie.

Il faut reconnaître que tous ces travaux laissent place à bien des incertitudes et la question de la fixation de l'azote n'était pas encore orientée dans sa direction véritable. Une voie nouvelle s'ouvre en 1885.

DUCLAUX² montre, au début de cette année, que des Haricots et des Pois mis à germer dans un sol stérile riche en matières organiques (lait), sont incapables d'utiliser ces substances si l'on élimine rigoureusement tous les microorganismes susceptibles d'être apportés par les graines ou l'air.

L'importance des microorganismes est mise alors en évidence dans la fixation de l'azote atmosphérique sur le sol par les expériences de BERTHELOT³.

Les sols étudiés par ce savant sont très pauvres en azote et ne contiennent à la fin des essais que de 1 à 3 grammes de matière organique par kilogramme. En voici la nomenclature :

1. SCHULTZ, Reinerträge auf leichtem Boden, *Landw. Jahrb.*, 1881, p. 771-848.

2. DUCLAUX, Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes, *C. R.*, t. C, 1885, p. 66.

3. BERTHELOT, Fixation de l'azote libre par certains terrains argileux, *C. R.*, t. CI, 1885, p. 775.

1° un sable argileux jaune; 2° un autre échantillon du même sable différant peu du précédent et sorti d'une fouille récente; 3° un kaolin brut, lavé, contenant 4,8 p. 100 de potasse; 4° une argile blanche contenant 6 p. 100 de potasse.

Ces sols sont d'abord analysés au triple point de vue de l'azote total, de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal, puis ils sont exposés à l'action de l'air, soit dans une chambre close, soit en plein air au-dessus d'une prairie, soit à la partie supérieure de la tour de 28 mètres du Laboratoire de Meudon, soit enfin dans des vases fermés. De temps en temps, on refait des dosages et l'on constate que la proportion de cet élément combiné va toujours en augmentant. Les chiffres suivants précisent la fixation opérée sur 2 kilogrammes de matière pendant une saison (avril à octobre 1885).

Substances.	Azote initial.	Flacon clos.	Chambre close.	Prairie.	Tour.
I. Sable jaune.	0gr,0910	0gr,1289	0gr,1179	0gr,0983	»
II. Sable.....	0gr,1119	0gr,1503	0gr,1639	0gr,1295	0gr,1396
III. Kaolin....	0gr,0210	0gr,0494	0gr,0407	0gr,0353	0gr,0557
IV. Argile....	0gr,1065	0gr,1236	»	0gr,1144	0gr,1497

On voit que cette fixation a été du même ordre dans tous les cas, sans que l'exposition à l'air ait donné lieu à quelque accroissement particulier attribuable aux composés azotés apportés par l'atmosphère, ainsi que le montre bien l'expérience faite en vase clos.

Si l'on rapproche de ces chiffres la surface des pots employés (113 cm²), on peut admettre des fixations de 16 à 32 kilogrammes à l'hectare, quantités considérables si on les compare à celles apportées sous forme nitrique ou ammoniacale par les eaux de pluie (évaluées à 8 kilogrammes par LAWES et GILBERT à Rothamsted et à 1 kg. 7 à Montsouris en 1883).

Bien plus, BERTHELOT a reconnu, en stérilisant les sols précédents par un courant de vapeur d'eau prolongé pendant cinq minutes, que la terre ainsi préparée, placée dans l'air privé d'organismes vivants par filtration sur des tampons de coton, avait perdu la propriété de fixer l'azote.

Il existerait donc dans les sables ou kaolins, matières pre-

mières des terres végétales, un ou plusieurs organismes susceptibles de fixer l'azote atmosphérique.

JOULIE¹ fait connaître des faits du même ordre. Il disposait dans une serre à toit de verre un certain nombre de vases en verre remplis de terre végétale, les uns sans engrais, les autres pourvus d'engrais minéraux plus ou moins complets, avec ou sans azote. Tous ces vases étaient ensemencés avec du Sarrasin. Celui-ci fut coupé au bout de 2 mois $1/2$; on sema alors du Ray-grass et du Trèfle dont on fit trois coupes, puis on procéda à l'analyse finale. Dans tous les essais il y avait gain d'azote à la fois par le sol et par les plantes. Une autre série d'expériences faites à l'aide de sable de Fontainebleau ensemencé avec du Sarrasin a donné lieu également à un gain que JOULIE attribue aux phénomènes électriques dont la plante est le siège.

LAURENT² reconnaît à son tour l'action favorable exercée par les microorganismes, en plantant de graines de Sarrasin stérilisées dans du terreau naturel, du terreau stérilisé naturel, du terreau stérilisé additionné d'engrais chimiques, du terreau stérilisé inoculé avec les Bactéries du sol. Le terreau stérile a donné le minimum de graines (23), le terreau naturel et le terreau inoculé le maximum (94-96) et celui additionné d'engrais, mais stérilisé, un nombre intermédiaire (66).

A ce moment HELLRIEGEL³ publie un travail, appelé au plus grand retentissement, sur les relations entre les Bactéries et la nutrition azotée des Légumineuses.

On savait, depuis les importantes observations de DEHÉRAIN⁴, que les Légumineuses jouissent du privilège de produire de très grandes quantités de matières organiques azotées sans se servir de l'azote du sol et que le sol s'enrichit même pendant la culture de ces plantes, malgré la déperdition considérable due aux récoltes.

1. JOULIE, Fixation de l'azote dans le sol cultivé, *Ann. agr.*, t. XII, 1886, p. 5.

2. LAURENT, Les microbes du sol, *Bull. Acad. de Belg.*, 3^e s., t. II, 1886, p. 128.

3. HELLRIEGEL, Ueber die Beziehungen der Bakterien zu der Stickstoffernährung der Leguminosen, *Zeitschr. des Vereins f. Rübenzucker Indust.*, 1886, p. 863.

4. DEHÉRAIN, Des pertes et des gains d'azote que subit la terre arable sous l'influence de diverses cultures, *Ann. agr.*, t. VIII, 1882, p. 321.

Or HELLRIEGEL, cultivant des Pois dans un sol privé d'aliments azotés et dans lequel les Graminées sans exception ont péri d'inanition, constate qu'une graine a fourni dans ces conditions :

	Matière sèche.	Graines.
En 1884.....	28 gr. 483	13 gr. 947
En 1885.....	{ 27 gr. 816	11 gr. 710
	{ 33 gr. 147	12 gr. 426
En 1886.....	20 gr. 372	8 gr. 953

Il est clair que ces plantes n'ont pas pris d'azote au sol, puisqu'il n'en renfermait pas; elles n'en ont pas emprunté non plus aux eaux d'arrosage, qui étaient rigoureusement purifiées. HELLRIEGEL en déduit que l'azote est tiré de l'atmosphère par les Légumineuses. Or, des expériences spéciales sur le Pois, ont montré que les combinaisons azotées qui se trouvent dans l'atmosphère (nitrates, nitrites, carbonate d'ammoniaque) ne peuvent pas être considérées comme suffisantes pour fournir la quantité d'azote nécessaire à la végétation. Il ne restait à envisager que l'assimilation possible de l'azote libre de l'air. On savait alors, depuis les travaux de BERTHELOT, que les Bactéries du sol jouissent de la propriété d'engager cet azote atmosphérique dans des combinaisons organiques et, d'un autre côté, que les petits tubercules qui garnissent en grand nombre les racines des Légumineuses sont remplis de Bactéries.

HELLRIEGEL s'est alors demandé s'il n'y avait pas une relation entre le développement de ces tubercules et l'assimilation de la plante tout entière.

Il prit 40 vases remplis d'une terre artificielle privée d'aliments azotés etensemencés avec des Pois. Dans 10 de ces vases, on introduisit des microorganismes en les arrosant avec 25 centimètres cubes d'une délayure de terre fertile.

La germination a été normale, mais bientôt les plantes avaient consommé leurs réserves nutritives et elles avaient pris une apparence chlorotique; aucune différence ne s'était jusqu'à ce moment manifestée entre les Pois des deux séries. Or, à quelques jours de là, un verdissement intense et une croissance vigoureuse pouvaient se remarquer dans les vases

inoculés, alors que presque toutes les autres plantes dépérissaient. En examinant les racines, HELLRIEGEL vit que les nodosités étaient apparues sur tous les pieds qui s'étaient développés. Le poids de leur matière sèche ne laissait d'ailleurs aucun doute sur la réalité de leur accroissement.

Une autre expérience a été faite sur des sols analogues, ensemencés de Bactéries du sol, puis stérilisés par la chaleur et recouverts de coton stérilisé. Des Pois semés dans ce sol ont germé, mais il n'ont pas tardé à donner des signes d'innutrition et à périr.

Bien plus¹, en prenant quatre Pois poussés dans des pots jusqu'au moment où l'on pouvait constater sur leurs racines la présence de nodosités et en les transplantant ensuite dans quatre cloches groupées de telle sorte que la première seule communique avec l'air libre, les autres communiquant toutes avec la cloche précédente par l'entremise d'un tube contenant de l'acide sulfurique, tous les Pois sont arrivés à maturité. Cette expérience semble bien montrer que le gain d'azote est dû à l'absorption de ce corps non à l'état de combinaison, mais à l'état libre.

WOLFF² confirme ces résultats. Il remarque que l'emploi des engrais azotés est très rémunérateur pour les Céréales, mais qu'il n'est nullement nécessaire au développement des Papilionacées, bien qu'une faible quantité de ces engrais semble rendre ces plantes plus aptes à s'assimiler l'azote provenant d'autres sources en les aidant à traverser la période transitoire qui précède la formation des nodosités.

HELLRIEGEL et WILFARTH³ précisent alors les phénomènes observés. Ils se disent que, à la suite d'une inoculation du sol par une délayure de terre, on ne peut attribuer le gain d'azote constaté sur les Légumineuses à la proportion des nitrates contenus dans la parcelle de terre ajoutée et ils sont conduits

1. HELLRIEGEL, cité par KAYSER, L'assimilation de l'azote au Congrès de Berlin en 1886, *Ann. agr.*, t. XII, 1886, p. 521.

2. WOLFF, *Id.*

3. HELLRIEGEL et WILFARTH, Untersuchungen über die Stickstoffernährung der Gramineen und Leguminosen, *Beilageh. zu der Zeitschr. des Vereins f. d. Rübenzucker Ind.*, nov. 1888, Trad. dans *Ann. Sc. agr.*, VII, t. I, 1890, p. 84 et 189.

à admettre que tout l'effet de cette délayure doit être attribué aux microorganismes qu'elle renferme; ils apportent à l'appui de cette opinion un certain nombre de raisons dont les principales sont les suivantes :

- a) Une quantité très minime de délayure suffit pour produire un effet complet;
- b) La délayure, maintenue en ébullition pendant 1/2 heure, perd totalement sa propriété fertilisante;
- c) Les délayures de terres de diverses provenances n'agissent pas de même sur toutes les Papilionacées.

D'autre part, la relation entre le développement des tubercules et la délayure de terre peut être facilement mise en évidence par l'expérience suivante : on trouve aisément dans un lot de plantules de Pois des individus qui, au lieu d'avoir développé une racine pivotante, ont formé deux racines divergentes. On cultive ces pieds anormaux à cheval sur deux vases placés côte à côte et contenant une solution nutritive sans azote. L'un des vases reçoit une délayure de terre, l'autre la même délayure stérilisée. Sans aucune exception, de nombreux tubercules apparaissent sur la racine plongeant dans le premier vase, pas un seul dans le second.

Considérons maintenant ce fait que, parmi les nombreux pieds de Légumineuses vivant dans un sol non stérilisé, mais privé d'azote assimilable, quelques-uns seulement, après avoir traversé une période de famine, se mettent à végéter vigoureusement. Sans cette particularité, on aurait pu se contenter d'expliquer la croissance des Légumineuses en faisant appel à la fixation directe de l'azote sur le sol démontrée par BERTHELOT; il est évident qu'ici, cette manière d'envisager les choses est insuffisante et qu'il faut admettre une relation beaucoup plus étroite, une véritable symbiose, entre la plante et les microorganismes.

HELLRIEGEL et WILFARTH reviennent enfin sur l'origine de l'azote en excès trouvé dans les Légumineuses. Ils sèment diverses plantes sur un sol privé d'azote combiné contenu dans de grandes cages traversées par un courant d'air qui a été débarrassé de toutes traces d'azote combiné et auquel on ajoute ensuite la proportion nécessaire d'acide carbonique. Le

gain d'azote n'en est pas moins considérable. Dans une de ces expériences, conduite exactement suivant les préceptes de BOUSSINGAULT, on a trouvé dans les récoltes les poids d'azote suivants :

Pois.....	o gr. 2335
Avoine.....	o gr. 0033
Sarrasin.....	o gr. 0006

On voit que le Pois seul a été capable d'assimiler l'azote libre de l'atmosphère et que si BOUSSINGAULT n'a pas pu observer une semblable assimilation par les Légumineuses, c'est qu'il les avait cultivées dans un sol stérilisé.

FRANK¹ combat l'opinion d'HELLRIEGEL. Il constate cependant que la déperdition d'azote subie par le sol considéré en lui-même est notablement diminuée et qu'elle se change même en accroissement par la présence d'une végétation consistant principalement en Lupins; aussi revient-il quelque temps après sur la question de savoir d'où vient cet excédent².

Il montre que l'augmentation de l'azote ne provient pas de l'ammoniaque, mais bien de l'atmosphère elle-même. Il pense que diverses conditions influent sur cette fixation, entre autres la porosité du sol, le degré de développement des plantes et la nature de l'espèce végétale, mais il refuse d'attribuer aux tubercules radicaux des Légumineuses un rôle particulier dans l'accroissement d'azote qui accompagne toujours la culture de ces plantes.

Nous verrons plus loin que cette opinion de FRANK est absolument contraire à la réalité.

Pendant qu'HELLRIEGEL poursuivait ses importantes recherches sur l'assimilation de l'azote par les Légumineuses, la fixation directe de ce gaz sur le sol continuait à exercer la sagacité des chercheurs.

1. FRANK, La statistique de l'azote en agriculture, *Ann. Sc. agr.*, 1888, t. II, p. 130. Voir aussi : Ueber die Quellen der Stickstoffnahrung der Pflanzen, *Deutsche landw. Presse*, 1886, et *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. IV, 1886, p. 293.

2. FRANK, Recherches sur la nutrition azotée des plantes et la rotation de l'azote au point de vue agricole, *Ann. agr.*, t. XV, 1889, p. 94; d'après *Landw. Jahrb.*, 1888. Voir aussi : La statistique de l'azote en agriculture, *Ann. Sc. agr.*, 1888, t. II, p. 24 et suiv.

GILBERT¹, de Rothamsted, se demande si l'azote libre peut être réellement fixé grâce aux Microbes du sol, comme le suppose BERTHELOT. Il fait remarquer que, jusqu'à une profondeur de 2 m. 75, il existe par hectare de 26 000 à 27 000 kilos d'azote sous forme de composés insolubles, tant dans le sol que dans le sous-sol, et il est toujours tenté de rapporter à cette source les excédents constatés.

Cependant BERTHELOT² étend aux terres végétales les expériences qu'il avait faites précédemment sur des sables ou des argiles. Chaque essai a porté sur une masse de terre pesant environ 50 kilos, préalablement séchée à l'air, débarrassée de ses cailloux et des matières végétales qu'elle pouvait contenir, puis mélangée avec soin. D'autres échantillons avaient été lavés jusqu'à épuisement des nitrates. On a introduit cette terre dans de grands pots de grès verni ou de porcelaine, de 1 500 centimètres cubes environ et de large surface. Ces pots étaient exposés à l'air, soit à la pluie, soit sous un hangar, avec ou sans végétation.

Pour éviter les longueurs, nous ne rapporterons ici que les résultats d'une seule expérience : terre lavée, sans végétation, exposée à la pluie dans un pot de 1 520 centimètres carrés de surface et pendant 7 mois 1/2 :

Azote initial de la terre.....	54 gr. 60
Azote apporté par la pluie. { ammoniacal.	0 gr. 048
{ nitrique	0 gr. 013
{ organique ..	0 gr. 013
Total.....	54 gr. 674

Produits à la fin de l'expérience :

Azote final de la terre.....	78 gr. 6
Azote nitrique dans l'eau de drainage.....	0 gr. 198
Azote ammoniacal (non dosé).....	»
Le total de l'azote final surpasse	78 gr. 8

D'après ces faits, la terre végétale a fixé continuellement l'azote atmosphérique libre, même en dehors de toute végéta-

¹. GILBERT, cité par KAYSER, L'assimilation de l'azote au Congrès de Berlin en 1886, *Ann. agr.*, t. XII, 1886, p. 521.

². BERTHELOT, Sur la fixation directe de l'azote gazeux de l'atmosphère par les terres végétales, *C. R.*, t. CIV, 1887, p. 205 et 625.

tion proprement dite. Ce gain ne peut être attribué aux apports par l'air d'azote combiné, d'autant plus qu'au cours de cet essai, la pluie a enlevé au sol plus d'azote qu'elle ne lui en a fourni. D'ailleurs la fixation a été plus active sur la terre exposée à la pluie que sur celle abritée, sans doute parce que la circulation de l'air et de l'eau ont imprimé une activité plus grande aux organismes fixateurs.

Des expériences parallèles ont été poursuivies avec le concours de la végétation. Une terre sans traitement, exposée à l'air et à la pluie, au milieu d'une prairie et avec ensemencement d'*Amarantus pyramidalis* a donné le bilan suivant :

Apports :

Azote initial de la terre.....	54 gr. 09
Azote apporté par la pluie.....	0 gr. 076
Azote apporté par l'ammoniaque de l'atmosphère, au plus.....	0 gr. 053
Azote apporté par les pieds d'Amarante...	0 gr. 35
Total.....	54 gr. 57

Produits :

Azote final de la terre.....	56 gr. 54
Azote entraîné par les eaux de drainage..	0 gr. 403
Azote final des plantes.....	2 gr. 235
Total.....	59 gr. 18

Il y a donc eu fixation de 4 gr. 61 d'azote. Ce gain est réparti à peu près également entre la terre (2 gr. 45) et les plantes (1 gr. 885).

BERTHELOT¹ fait alors intervenir les Légumineuses dans ses expériences. En 1888, c'est-à-dire l'année même où HELLRIEGEL et WILFARTH complétaient les résultats importants du premier mémoire d'HELLRIEGEL, BERTHELOT publie un travail considérable au cours duquel il a varié autant que possible les conditions expérimentales, en opérant tantôt sur la terre nue, tantôt sur un sol couvert de Légumineuses, à l'air libre, sous un abri transparent permettant la libre circulation de l'air et

1. BERTHELOT, Expériences nouvelles sur la fixation de l'azote par certaines terres végétales et par certaines plantes, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XVI, 1889, p. 433. Voir aussi : *C. R.*, t. CVII, 1888, p. 372; t. CVIII, 1889, p. 700; t. CIX, 1889, p. 277.

de la lumière, ou bien encore sous de grandes cloches de 45 litres de capacité hermétiquement closes ou parcourues par un courant d'air purifié par passage sur l'acide sulfurique (on avait soin dans ce dernier cas d'introduire dans les cloches environ 1 litre d'acide carbonique par jour pour subvenir aux besoins de la végétation). Quelques-unes de ces expériences ont été faites en terre stérilisée et d'autres dans une terreensemencée avec les Microbes supposés aptes à produire la fixation de l'azote.

Trois essais effectués sous cloche avec trois terres de richesse différente ont donné lieu à une fixation d'azote qui provenait évidemment de l'azote gazeux contenu dans la cloche. Une des terres dont la teneur initiale était par kilo sec de 0 gr. 974, a fait en deux mois un gain de 8,6 p. 100 de l'azote initial; la deuxième terre, qui contenait au début 1 gr. 655 d'azote combiné en a gagné 2,2 p. 100 dans le même laps de temps; la troisième, dont la teneur initiale était de 1 gr. 744, a gagné 4,3 p. 100. Les expériences faites à l'air libre, sous abri, ont donné respectivement des gains de 7,3, 5,8 et 6,1 p. 100. Enfin à l'air libre, sans abri, on a obtenu des gains de 8,8, 9,1 et 1,7 p. 100.

Ces mêmes terres, mélangées avec une infusion provenant du contenu des tubercules radicaux des Légumineuses ne fixent pas l'azote en quantité plus grande qu'en l'absence d'infusion. Les Bactéries renfermées dans ces tubercules ne paraissent donc pas susceptibles de communiquer au sol la propriété fixatrice. Cependant il s'agit bien dans le phénomène d'une intervention microbienne, car il ne se manifeste plus lorsque les terres ont été stérilisées par chauffage à 110°.

Il restait encore à régler la question des relations entre l'ammoniaque atmosphérique et la terre végétale, pour connaître l'importance des quantités d'azote que cet alcali peut apporter au sol dans les conditions ordinaires. BERTHELOT (*loc. cit.*, p. 484) expose l'une des terres étudiées précédemment à l'action de l'air sous un hangar librement ouvert et il l'additionne d'un peu de carbonate de chaux. Au bout de six mois, la dose d'ammoniaque libre et de sels ammoniacaux solubles

dans l'eau pure ne s'était pas accrue d'une façon sensible, de même que la proportion d'ammoniaque susceptible d'être extraite par l'action des acides étendus. Le même résultat est noté dans une autre expérience ayant duré dix-huit mois. On voit donc que l'absorption de l'ammoniaque par le sol est un phénomène extrêmement restreint et que, contrairement à l'opinion ancienne, l'apport d'azote par cette voie est à peu près négligeable.

BERTHELOT, tout en remarquant dès ses premières expériences qu'une fixation de l'azote sur la terre non couverte de végétation ne se fait que dans des conditions de vitalité des Microbes qui la peuplent et en concluant que cette fixation est due à leur action, ne donnait pas au mot « Microbe » la signification qui lui est attribuée ordinairement par les biologistes. Il y comprenait non seulement des Bactéries, mais toutes sortes de végétaux inférieurs habitant le sol : Algues, Mucédinées, Infusoires même. Les recherches de WINOGRADSKY pour les Microbes, de SCHLÆSING fils et LAURENT pour les Algues viendront préciser tous ces points obscurs.

Pendant que BERTHELOT poursuivait ses importants travaux, d'autres auteurs reprenaient les observations de HELLRIEGEL et WILFARTH et leur donnaient la confirmation la plus absolue.

ATWATER et WOODS¹ trouvent que, dans la culture du Pois, la moitié au moins de l'azote provient de l'atmosphère.

LAWES et GILBERT² reproduisent avec un plein succès les expériences d'HELLRIEGEL et WILFARTH. Ils voient des Lupins semés dans du sable acquérir un développement plus considérable et fixer une dose d'azote plus forte quand ce sable a été arrosé avec de l'eau de lavage d'une terre qui avait porté des Lupins l'année précédente que lorsque ce sable est abandonné à lui-même sans aucune préparation.

1. ATWATER et WOODS, The acquisition of atmospheric nitrogen by plants, *Amer. chem. Jnal.*, t. XIII, 1891, p. 42.

2. LAWES et GILBERT, New experiments on the question of the fixation of free nitrogen. *Proceed. Roy. Soc.*, t. XLVII, 1890.

WILFARTH¹, RICHTER², PETERMANN³ confirment les observations précédentes pour les plantes herbacées et FRANK⁴ pour une Légumineuse arborescente, le *Robinia pseudo-Acacia*.

Ce dernier auteur⁵ montre d'ailleurs que, si les Légumineuses peuvent assimiler l'azote libre de l'air, cela ne les empêche pas d'assimiler également celui de diverses combinaisons azotées, telles que les nitrates, les sels ammoniacaux, les substances complexes contenues dans les excréments des animaux, etc. Cependant, la symbiose sans engrais azoté agit plus favorablement que l'engrais azoté seul, sans symbiose. Il n'y a d'exception que pour le Pois qui, malgré la symbiose, profite encore de l'appoint d'azote apporté par les engrais et fournit dans ces conditions un supplément de récolte. FRANK va même plus loin. Il attribue aux Légumineuses la propriété d'assimiler l'azote de l'air sans le concours des Microbes des nodosités, au moins dans les bonnes terres. Cette manière de voir n'a d'ailleurs pas été confirmée par la suite.

Cependant, tous les auteurs qui se sont occupés de la question ont démontré l'intervention de l'azote atmosphérique dans la végétation des Légumineuses par la méthode indirecte, en dosant d'une part l'azote introduit dans les cultures par les graines et le sol, et en déterminant d'autre part l'azote renfermé dans les plantes obtenues. La différence représente l'azote emprunté à l'atmosphère.

SCHLÆSING fils et LAURENT⁶ ont voulu démontrer cette fixation en mesurant le volume d'azote contenu dans une atmosphère où végétaient des Légumineuses avant et après leur développement. Voici leur mode opératoire :

1. WILFARTH, Ueber Stickstoffaufnahme der Pflanzen, *Tagebl. d. 60 Naturf. Vers. zu Wiesbaden*, 1887, p. 362.

2. RICHTER, Zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 221.

3. PETERMANN, Contribution à la question de l'azote, *Bull. Acad. r. de Belgique*, 3^e s., t. XVIII, 1888, p. 632, 634; t. XX, 1890, p. 431; t. XXIII, 1893, p. 267.

4. FRANK, Ueber Assimilation von Stickstoff der Luft durch *Robinia pseudo-Acacia*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VIII, 1890, p. 292.

5. FRANK, Inwieweit ist der freie Luftstickstoff für die Ernährung der Pflanzen verwertbar? *Deutsche landw. Presse*, 1891, p. 779.

6. SCHLÆSING fils et LAURENT, Sur la fixation de l'azote gazeux par les Légumineuses, *C. R.*, t. CXI, 1890, p. 750.

« Dans une sorte d'allonge cylindrique en verre, on introduit du grès calciné, imbibé d'une dissolution nutritive minérale exempte d'azote. L'allonge est stérilisée avec son sable et toutes les précautions sont prises pour en fermer l'entrée aux gaz de l'extérieur. On y sème trois graines de Pois nains (Pois Gonthier) qu'on arrose avec un peu d'eau pure où l'on a broyé quelques nodosités fraîches de Pois et de Fèves de pleine terre, et l'on place l'allonge au midi, sur une fenêtre.

« Par deux tubulures latérales, l'allonge est mise en communication avec un dispositif comprenant une trompe à mercure et un tube de Bohème rempli de tournure de cuivre et couché au-dessus d'une rampe de gaz. On peut ainsi prendre, au moyen de la trompe de petits échantillons de l'atmosphère de l'allonge et les analyser sans aucune perte d'azote. Quand l'analyse en indique la nécessité, on introduit dans l'appareil de l'acide carbonique, ou bien on absorbe de l'oxygène en chauffant la colonne de cuivre et en y faisant passer le gaz toujours avec la trompe.

« Dès que les graines sont semées, on fait le vide parfait dans tout le système, puis on y introduit successivement de l'oxygène (20 à 25 p. 100), de l'acide carbonique (6 à 9 p. 100) et de l'azote (60 à 70 p. 100), ce dernier gaz étant mesuré avec exactitude dans un volumétre. »

Les auteurs ont ainsi exécuté deux expériences avec les Pois; les plantes n'ont pas pris un grand développement, mais elles étaient saines et vigoureuses. Elles ont donné des fleurs, mais n'ont pas fructifié. Les chiffres suivants ont été obtenus à l'analyse finale :

Méthode directe :

	Expérience I. centimètres cubes.	Expérience II. centimètres cubes.
Azote gazeux introduit.....	2681,2	2483,3
Azote extrait.....	2652,1	2457,4
Différence ou azote gazeux fixé.....	29,1 (36 ^{mgr} ,5)	25,9 (32 ^{mgr} ,5)

Méthode indirecte :

	Expérience I. milligrammes.	Expérience II. milligrammes.	Expérience III. milligrammes.
Azote du sol avant l'expérience.	4,3	4,3	4,3
Azote des graines.....	28,3	28,2	28,2
Azote du sol après l'expérience.	15,1	17,5	8,8
Azote des plantes entières.....	58,1	49,1	24,3
Différence.....	40,6	34,1	0,6

Dans l'expérience III, les Pois n'avaient pas été inoculés, aussi leurs racines ne portaient-elles pas de nodosités.

La fixation de l'azote sur le sol avec le concours des Légumineuses était donc démontrée de la façon la plus péremptoire. Nous verrons plus loin que les recherches concernant l'isolement du Microbe symbiote et sa biologie apportèrent une éclatante confirmation à cette nouvelle théorie.

Il restait à savoir si des plantes appartenant à d'autres familles que les Légumineuses étaient susceptibles de fixer également l'azote atmosphérique.

**LES PLANTES PHANÉROGAMES APPARTENANT A
DES FAMILLES AUTRES QUE LES LÉGUMINEUSES
ASSIMILENT-ELLES DIRECTEMENT L'AZOTE ATMO-
SPHÉRIQUE?**

Nous avons vu précédemment que G. VILLE avait, dès 1849, observé un gain d'azote en cultivant dans du sable calciné amendé avec les matières minérales nécessaires du Cresson alénois associé avec des Lupins ou même du Colza seul.

A partir du moment où HELLRIEGEL eut démontré le pouvoir fixateur des Légumineuses pourvues de nodosités, divers expérimentateurs se sont demandé de nouveau si les plantes appartenant aux autres familles possédaient la même propriété.

LAWES et GILBERT¹ avaient transformé en prairies, en 1856, une partie du domaine de Rothamsted qui, depuis longtemps, avait servi à la culture des Céréales. Le sol renfermait alors

¹. LAWES et GILBERT, Étude sur les prairies permanentes, *Jnal. Roy. Agr. Soc.*, t. XXI, I. Trad. dans *Ann. agr.*, t. XVI, 1890, p. 166.

1,52 d'azote pour 1 000. On l'a fumé régulièrement de manière que l'azote des engrais dépassât celui des récoltes de 15 kilos environ chaque année. Il est clair que, dans ces conditions, on ne saurait prétendre couvrir les pertes dues au drainage. Cependant, la terre s'est enrichie au lieu de s'appauvrir et, à la fin de 1888, elle dosait 2,35 p. 1 000, c'est-à-dire 0,83 de plus qu'à l'origine. Le phénomène est d'ailleurs progressif et rien ne faisait supposer qu'il approchait de sa limite.

PAGNOUL¹, faisant des expériences comparatives sur un sol nu, riche en matières organiques et sur le même sol ensemencé avec des Graminées ou avec du Trèfle constate que le gain est très faible sur la terre nue, tandis qu'il est considérable avec les Légumineuses; enfin, la terre recouverte de Graminées s'est aussi enrichie considérablement, quoique d'une façon moindre que dans le cas d'une culture de Légumineuses.

MAQUENNE² admet que le rôle des prairies naturelles dans l'enrichissement du sol est du même ordre que celui des Légumineuses.

FRANK³, ayant cultivé de l'Avoine, du Sarrasin, de la Spargule, du Navet, etc., dans des sols divers (sable ou argile), trouve que ces plantes peuvent assimiler l'azote de l'air et produire une grande quantité d'azote organique, sans enlever d'azote combiné au sol. Il s'est alors demandé si l'enrichissement était dû aux racines de la plante qu'il n'a pas pu enlever complètement ou bien aux microorganismes observés par BERTHELOT. En faisant des expériences comparatives sur des vases renfermant du sable et de l'argile et ensemencés avec les plantes ci-dessus et sur d'autres vases renfermant le même sol, mais nus, il constate que les terres nues se sont enrichies aussi bien que les terres cultivées, ce qui est conforme aux conclusions de BERTHELOT.

BRÉAL⁴, ayant obtenu en cultivant du Cresson alénois dans

1. PAGNOUL, Expériences relatives aux pertes et aux gains d'azote éprouvés par les terres nues ou cultivées, *Ann. agr.*, t. XVI, 1890, p. 250.

2. MAQUENNE, L'azote atmosphérique et la végétation, *Ann. agr.*, t. XVII, 1891, p. 145.

3. FRANK, Die Assimilation des freien Stickstoffes bei den Pflanzen, *Landw. Jahrb.*, t. XXI, 1892, p. 3.

4. BRÉAL, Fixation de l'azote gazeux pendant la végétation, *Ann. agr.*, t. XVIII, 1892, p. 369.

du gravier de rivière très pauvre en matières organiques, des récoltes remarquables et en outre un gain d'azote sur le sol, a eu l'idée, en 1891, de reprendre les essais de G. VILLE, en cultivant le Cresson dans du gravier additionné de faibles proportions de chlorure de potassium, de sulfate de magnésie et de phosphate de chaux. Il a constaté de cette manière que le milieu nutritif suffit aux besoins du Cresson, à condition d'opérer dans des vases de grandes dimensions renfermant de 2 à 10 kilos de sable ou de terre. Les plantes ainsi développées renferment infiniment plus d'azote que n'en contenaient les graines et l'eau d'arrosage. Il admet alors que le Cresson et le sol ont emprunté de l'azote à l'atmosphère.

LIEBSCHER¹ trouve également que certaines plantes non Légumineuses peuvent assimiler l'azote libre : en première ligne la Moutarde et, à un degré moindre l'Avoine; mais ces plantes ne posséderaient la propriété en question que lorsqu'elles sont très robustes et qu'elles sont abondamment pourvues d'engrais azotés.

STOKLASA² admet, avec FRANK, que l'assimilation directe de l'azote gazeux est l'apanage de toutes les Phanérogames, quoiqu'elle se manifeste avec des intensités variables.

PROVE³ conteste tous ces résultats. Il trouve que, dans un sol additionné d'engrais, les plantes autres que les Légumineuses déterminent toujours une perte notable d'azote, la quantité de cet élément contenue dans la récolte ne couvrant pas le déficit constaté dans le sol.

WAGNER⁴ s'élève plus particulièrement contre les conclusions de LIEBSCHER. D'après lui, la récolte de la Moutarde en terre peu azotée dépend absolument de la quantité d'azote fournie. Cette communication provoque entre LIEBSCHER et WAGNER une polémique au cours de laquelle le premier de ces auteurs modifie son opinion; il admet alors que la Moutarde, incapable d'assi-

1. LIEBSCHER, Beitrag zur Stickstofffrage, *Jnal f. Landw.*, t. XLI, 1893, p. 139.

2. STOKLASA, Studien über die Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanzen, *Landw. Jahrb.*, t. XXIV, 1895, p. 827, 863.

3. PROVE, Untersuchungen über den Stickstoffgehalt der Böden nach dem Anbau verschiedener landwirtschaftlicher Kulturgewächse, *Zeitschr. d. landw. Ver. in Bayern*, 1893, p. 59 et 101.

4. WAGNER, Stickstoffaufnahme durch den Senf, *Deutsche landw. Presse*, 1893, p. 901.

miler directement l'azote atmosphérique, serait en état d'absorber l'azote des Bactéries des Légumineuses, surtout lorsqu'elle pousse vigoureusement. Cette manière de voir est basée sur les travaux récents qui montrent que les Bactéries des nodosités peuvent assimiler l'azote libre en dehors de la symbiose.

NOBBE et HILTNER¹, cultivant de la Moutarde, du Sarrasin et de l'Avoine comparativement avec des Lentilles, en sol stérilisé et ensemencé avec une trace de sols ayant porté respectivement les mêmes plantes, constatent que les Légumineuses occasionnent un gain d'azote, alors que, dans tous les autres cas, l'azote est resté sensiblement stationnaire.

ÆBY² n'a pas obtenu non plus le moindre gain avec la Moutarde.

Parmi les auteurs qui ont montré que diverses plantes non Légumineuses, telles que l'Orge, l'Avoine, le Cresson, la Moutarde, etc., ne peuvent pas fixer directement l'azote atmosphérique, nous nous bornerons à citer sans plus de détails : PETERMANN³, DAY⁴, SCHLÆSING fils et LAURENT⁵, RICHTER⁶, PFEIFFER et FRANK⁷, VON KOWERSKY⁸, LOTSY⁹, etc.

Il existe cependant diverses Phanérogames auxquelles on a attribué la propriété de fixer l'azote à la manière des Légumineuses, les *Alnus* et les *Elwagnus*, par exemple ; nous reviendrons sur leur étude dans un prochain chapitre.

Pour le moment, nous nous contenterons de relever les divergences d'opinions relatives aux relations des non Légumi-

1. NOBBE et HILTNER, Vermögen auch Nichtleguminosen freien Stickstoff aufzunehmen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1895, p. 155.

2. ÆBY, Beitrag zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVI, 1896, p. 409, 438.

3. PETERMANN, Contribution à la question de l'azote, *Bull. Acad. roy. de Belgique*, t. XXIII, 1893, p. 267.

4. DAY, *Transact. of the Bot. Soc. of Edimburg*, 1893, cité par JACOBITZ, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 883.

5. SCHLÆSING fils et LAURENT, Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 776.

6. RICHTER, Zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 221.

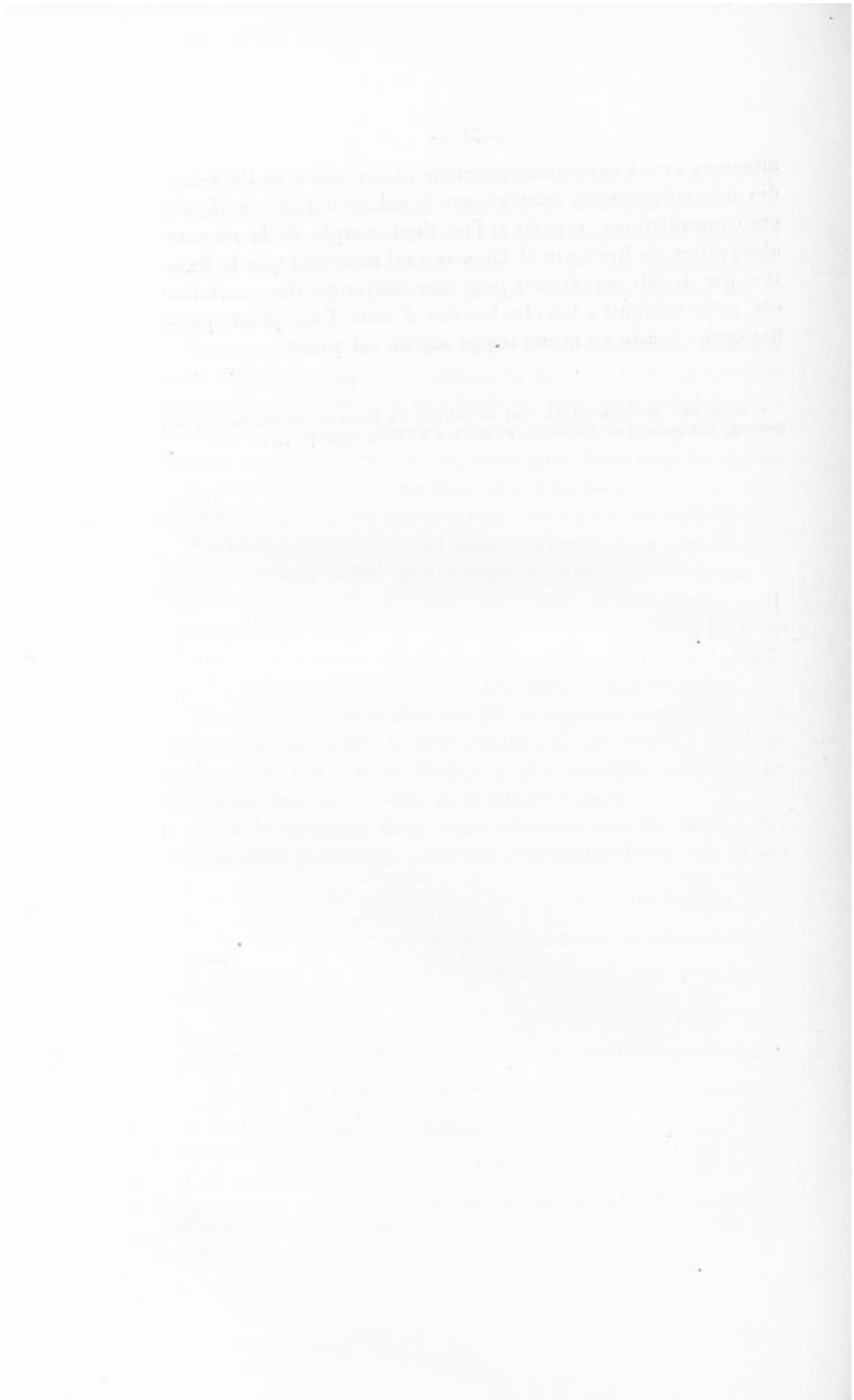
7. PFEIFFER et FRANK, Dritter Beitrag zur Frage der Verwertung elementaren Stickstoff durch den Senf, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVI, 1896, p. 117, 151.

8. VON KOWERSKI, Der weisse Senf als Stickstoffvermehrter des Bodens, *Inaug. Diss.*, Halle, 1895.

9. LOTSY, A contribution to the investigation of the assimilation of free atmospheric nitrogen by withe and Black Mustard, *Office of exp. St.*, Bull. n° 18.

mineuses avec l'azote atmosphérique : la présence ou l'absence des microorganismes fixateurs sur le sol suffit pour expliquer ces contradictions, surtout si l'on tient compte de la récente observation de BOUILHAC et GIUSTINIANI¹ montrant que la fixation par de tels organismes peut être suffisante, dans certains cas, pour subvenir à tous les besoins d'azote d'une plante phanérogame semée en même temps sur un sol pauvre.

1. BOUILHAC et GIUSTINIANI, Sur la culture du Sarrasin en présence d'un mélange d'Algues et de Bactéries, *C. R.*, t. CXXXVII, 1903, p. 1275.



CHAPITRE II

Essais de culture des Microorganismes fixateurs de l'Azote atmosphérique sur le sol.

RECHERCHES DE WINOGRADSKY

DEHÉRAIN et MAQUENNE¹ avaient observé qu'une solution sucrée additionnée de phosphates etensemencée avec les ferments de la terre éprouve une fermentation énergique.

WINOGRADSKY² a répété ces expériences en employant également comme matière fermentescible le sucre auquel il a ajouté des sels minéraux, mais en privant rigoureusement les liquides d'azote combiné. La fermentation s'est produite néanmoins, avec formation d'acide butyrique, d'acide acétique et d'hydrogène, mais on peut constater que le nombre d'espèces capables de vivre dans ces conditions est restreint. WINOGRADSKY n'en a trouvé que trois : un grand Bacille portant souvent des spores, se réunissant en masses zoogléiques mamelonnées et paraissant très vigoureux, puis deux autres Bactéries bien différentes qui manifestaient, dans le milieu nutritif utilisé, un air de souffrance non douteux.

Les premiers dosages qui ont eu lieu avec ces cultures impures ont décelé des gains d'azote très sensibles. Plus tard³,

1. DEHÉRAIN et MAQUENNE, Sur la réduction des nitrates dans la terre arable, *Ann. agr.*, t. IX, 1889, p. 6.

2. WINOGRADSKY, Fixation de l'azote gazeux par les microorganismes, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 1385.

3. WINOGRADSKY, Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les microbes, *C. R.*, t. CXVIII, 1894, p. 353.

les gains ont été encore plus importants avec les mêmes cultures impures, faites en présence de dextrose à laquelle on ajoutait parfois des quantités variées d'azote sous forme de sulfate d'ammoniaque. Cette introduction en proportions très faibles s'est montrée tout à fait favorable.

WINOGRADSKY¹ a cherché alors à isoler ces Microbes du sol en recourant à la méthode des cultures électives, c'est-à-dire capables de dévoiler une seule fonction déterminée ou plus exactement une fonction très limitée. On atteint ainsi un double but : on crée des conditions favorables pour le développement du Microbe dont la fonction donnée est une propriété spéciale et on éloigne les nombreux organismes étrangers pour lesquels ces conditions sont défavorables.

WINOGRADSKY avait besoin pour ses recherches d'un milieu de culture dépourvu de matières azotées ou n'en contenant que des quantités minimales, mais renfermant des sels minéraux et du carbone. Voici la formule à laquelle il s'est arrêté :

Eau distillée.....	1000 centimètres cubes.
Phosphate de potasse.....	1 gramme.
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 50 .
Chlorure de sodium.....	} de 0 gr. 010 à 0 gr. 020
Sulfate de fer.....	
Sulfate de manganèse.....	

Dans un certain nombre de fioles d'ERLENMEYER, on dispose 100 centimètres cubes de cette solution additionnée de 2 à 4 grammes de dextrose pur et d'un peu de carbonate de chaux, puisensemencée avec des traces de terres diverses. Les cultures étaient faites sous des cloches à vide, à accès d'air filtré et débarrassé de son azote combiné par passage dans des tubes à ponce sulfurique et à ponce potassée. Dans quelques-unes des fioles, on a pu observer un dégagement de gaz se faisant autour de masses gélatineuses, arrondies, bosselées, rappelant par leur forme et leur coloration blanchâtre les grains de Képhir, mais plus petites et moins consistantes. Le liquide fermenté dégageait une odeur butyrique et avait une

1. WINOGRADSKY, Absorption par des microorganismes de l'azote libre de l'air, *Arch. des Sc. biol. de l'Inst. imp. de Méd. exp. de St-Petersbourg* (édit. franç.), t. III, fasc. IV, 1895, p. 297.

réaction acide. En neutralisant à plusieurs reprises avec une solution faible de carbonate de soude, la fermentation continuait sans s'affaiblir jusqu'à complète disparition du sucre. A partir de ce moment, des Mucédinées diverses, notamment *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, etc., se mirent à pousser assez énergiquement en recouvrant les grains blancs devenus inertes et il en résultait des cultures assez riches et abondamment fructifiées.

Le développement des Moisissures, après avoir duré assez longtemps, s'arrêta à son tour; le liquide avait perdu complètement son odeur butyrique. Alors apparaissent certaines Algues vertes dont on a finalement de très riches cultures qui durent indéfiniment.

Examinées au microscope, les masses blanches du début étaient formées d'un mélange de filaments bactériens uniformes parmi lesquels se trouvaient des amas d'un *Clostridium* volumi-

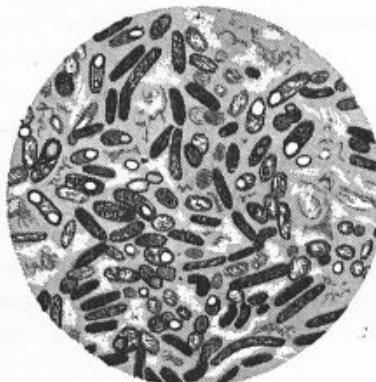


Fig. 1. — *Clostridium Pasteurianum* Winog.
(D'après WINOGRADSKY.)

neux. A l'état jeune, cet organisme se présente sous forme de bâtonnets cylindriques droits, de $1\ \mu\ 2$ de largeur avec une longueur double ou triple. La multiplication la plus active se fait sous cette forme. Avec le temps, la culture devient plus faible et le Bacille prend l'apparence *Clostridium*, c'est-à-dire se renfle au milieu jusqu'à doubler son diamètre, en se rétrécissant aux deux bouts. Il se colore alors par l'iode en violet foncé et présente à l'un de ses pôles des granulations qui se transforment progressivement en spore. La spore adulte occupe le centre de la cellule et est entourée par une capsule gélatineuse caractéristique, triangulaire, à extrémités légèrement arrondies. Elle mesure $1\ \mu\ 5$ à $1\ \mu\ 7$ sur $1\ \mu\ 3$ à $1\ \mu\ 5$.

Pour se débarrasser des organismes étrangers, WINOGRADSKY essaya de chauffer la culture pendant dix minutes à

75°. Le résultat fut assez satisfaisant. Outre le *Clostridium* prédominant dans la culture chauffée, on trouvait cependant encore un bâtonnet très mince de $0\ \mu\ 5$ d'épaisseur, sous forme de filaments longs et contournés, avec spores dans des renflements terminaux, et un gros Bacille de $2\ \mu$ d'épaisseur, constituant de long filaments qui se divisent en chainettes d'articles sporogènes arrondis.

Pour avoir de meilleurs résultats, WINOGRADSKY a songé alors à ajouter du carbonate de chaux en poudre au milieu nutritif, ce qui eut pour effet de condenser les colonies à la partie inférieure des fioles. Après l'ensemencement, apparaît au fond une tache grise criblée de trous par suite du dégagement d'acide carbonique. La tache s'étend sur toute la surface de la craie et, à mesure que celle-ci se dissout, apparaissent des masses blanches gélatineuses couvrant le fond d'une membrane épaisse.

L'analyse des liquides provenant de cultures âgées de quelques semaines ou de quelques mois a montré que là où il y avait eu une fermentation butyrique et une décomposition d'une quantité notable de matière sucrée, la proportion d'azote avait augmenté. Dans les cultures aérobies, à 1 gramme de dextrose brûlé correspondait 2,5 à 3 milligrammes d'azote absorbé. Si la dose ou la concentration du sucre était plus grande, l'azote absorbé diminuait. Dans les tubes qui n'avaient pas fermenté, aucune augmentation n'a été notée, même si la multiplication des Moisissures et des Bactéries y avait eu lieu.

L'absorption de l'azote de l'air se faisait donc par l'action concomitante des trois espèces microbiennes. Pour préciser le phénomène, WINOGRADSKY a isolé alors les trois Microbes en culture sur plaques, avec le même milieu solidifié par la gélose. Il a trouvé que le gros bâtonnet (Bacille α) possède toutes les propriétés d'un organisme aérobie et que le bâtonnet mince (Bacille β) peut être classé parmi les aérobies facultatifs. Ni l'un ni l'autre ne peuvent vivre dans un milieu privé d'azote, ni provoquer la fermentation du sucre.

Quant au *Clostridium*, il a pu être isolé de la manière suivante : on ensemence un peu de terre fraîche dans un liquide sucré exempt de combinaisons azotées; on y fait passer un

courant continu d'azote gazeux ; on fait trois ou quatre réensemencements successifs ; on chauffe les spores mûres à 80° pendant quinze minutes et onensemence finalement des plaques de PETRI renfermant des tranches de pommes de terre frottées de craie en poudre et disposées dans des exsiccateurs renfermant une solution de pyrogallate de potasse et dans lesquels on fait le vide. On obtient ainsi des colonies dont l'aspect est celui de petites masses mamelonnées, de couleur jaunâtre, n'excédant jamais 1 millimètre en longueur et en hauteur. Les tranches sans craie dégagent une forte odeur d'acide butyrique.

Au point de vue morphologique, l'organisme qui nous occupe se rapproche du *Clostridium butyricum* dont il diffère assez cependant pour que WINOGRADSKY en ait fait une espèce nouvelle qu'il désigne sous le nom de *C. Pasteurianum*.

Propriétés biologiques du « Clostridium Pasteurianum ».

— Le *Clostridium Pasteurianum*, ainsi que nous l'avons vu en étudiant son mode d'isolement, est un anaérobie vrai. En effet, lorsqu'on opère en présence de l'air, il est impossible d'obtenir une décomposition sensible du sucre ; au contraire ce phénomène se manifeste dans le vide. Bien plus, en reconstituant le mélange des trois Microbes, on constate que la culture mixte peut provoquer la fermentation, même au contact de l'air.

On voit donc que le *Clostridium*, *microbe strictement anaérobie*, peut vivre normalement et pendant un nombre indéfini de générations dans un milieu aéré, s'il est protégé de l'action de l'oxygène par l'association d'espèces aérobies.

L'action favorisante des deux Bacilles n'a d'ailleurs rien de spécifique ; le *Penicillium*, l'*Aspergillus* ou toute autre Bactérie banale poussant en voile produit le même résultat.

Le *Clostridium*, à l'état de pureté, ne pousse ni sur bouillon, ni sur gélatine. Une température de 34° exerce une influence défavorable. Enfin la présence constante d'azote gazeux dans le mélange nutritif libre d'azote combiné est une condition essentielle pour le développement du Microbe, bien qu'un excès de ce gaz n'ait aucune influence sur le caractère du phénomène de la fixation.

L'azote fixé se retrouve presque totalement à l'état de combinaisons organiques insolubles.

Disons enfin que le *Clostridium* est un ferment butyrique vrai. Les produits de la fermentation qui se retrouvent dans le liquide sont : de l'acide butyrique normal et de l'acide acétique, le premier étant dans la proportion de 3 ou 4 pour 1 du second. Outre ces acides, il n'y a, comme produit volatil, que des traces d'un alcool supérieur. Pas d'acide fixe, tout au plus quelques traces infinitésimales d'acide lactique.

Les gaz de la fermentation sont surtout formés d'hydrogène (60 à 75 p. 100) et d'acide carbonique.

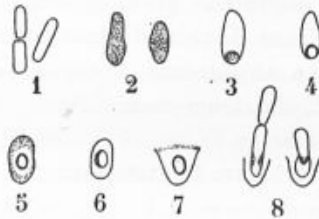


Fig. 2. — Schémas représentant les stades successifs de développement du *Clostridium Pasteurianum* Winog. — (D'après WINOGRADSKY.)

WINOGRADSKY¹, dans une communication ultérieure, complète ces premières données. Il représente schématiquement de la manière ci-contre le cycle du développement du *Clostridium Pasteurianum*.

1. — Jeune Bacille de 1,2 à 1,3 μ d'épaisseur, sur 1,5 à 2 μ de long, fréquemment cylindrique, avec extrémités tronquées. Se colore facilement par les couleurs basiques d'aniline et en jaune par l'iode. C'est le stade de multiplication du Microbe et son mode habituel de reproduction.

2. — Les filaments les plus longs, au lieu de se diviser, prennent la forme de fuseaux, tandis que leur plasma devient granuleux. Les couleurs d'aniline les colorent moins bien, mais l'iode les colore en violet intense.

3. — Il apparaît à un pôle une granulation sporogène dont la forme ovale rappelle celle de la spore adulte, mais qui est plus petite. Le bleu de méthylène la colore en bleu foncé, tandis que le reste de la cellule est bleu clair. Sous l'action de l'iode, la granulation reste incolore, les autres parties étant bleu violet foncé.

1. WINOGRADSKY, *Clostridium Pasteurianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 43 et 107.

4. — La granulation sporogène grossit et s'arrondit. Elle se colore plus difficilement par les couleurs d'aniline. La cellule mère se colore encore par l'iode, mais plus faiblement.

5. — La spore, parvenue à sa grosseur, passe au milieu de la cellule. L'iode ne donne plus de coloration qu'à la périphérie ou communique à la cellule un aspect marbré.

6. — La coloration par l'iode commence à disparaître. La spore est arrondie et la cellule mère ne montre aucun signe de gélification. Elle est alors remplie par une substance hyaline nettement délimitée; la membrane se colore bien par les couleurs d'aniline, la substance hyaline à peine.

7. — La spore arrondie ($1\mu 6$ sur $1\mu 3$) se trouve maintenant dans une masse gélatineuse, arrondie-triangulaire, à contours nets sur deux côtés, diffus sur l'autre. Cette coque est un produit de métamorphose de la cellule mère.

8. — En portant cette spore dans une solution sucrée, en culture anaérobie, on obtient bientôt la germination. La spore se gonfle considérablement et, comme premier signe de la germination, devient colorable par le bleu de méthylène et le violet de gentiane. Sa paroi polaire se rompt au voisinage de la face ouverte de la capsule et la jeune Bactérie sort. Le filament bactérien se divise souvent tout en étant encore contenu dans la capsule qui le coiffe alors comme un doigt de gant.

Les spores peuvent garder plusieurs années leur pouvoir germinatif.

Il est facile d'obtenir le *Clostridium* sur milieu solide en culture anaérobie.

Sur pomme de terre, on observe des colonies verruqueuses, gris jaunâtre, de 1 millimètre de diamètre et dégageant une odeur pénétrante de fromage. Sur carotte, les manifestations fermentatives l'emportent et se traduisent par la production de flocons muqueux qui se réunissent en masses.

Sur ces milieux, en culture pure dans le vide, le Bacille peut prendre la forme de Vibrions, ou toute autre forme d'invololution.

Les cultures sont difficiles à obtenir sur agar sucré, nulles sur gélatine; sur bouillon, le Bacille refuse souvent aussi de croître.

Comme agent fermentescible, le *Clostridium Pasteurianum* présente encore les particularités suivantes :

1° Il fait fermenter seulement le dextrose, le lévulose, le sucre de canne, l'inuline, le galactose et la dextrine. Il laisse inattaqués de nombreux sucres et alcools supérieurs et se classe ainsi parmi les ferments butyriques les moins polyphages.

2° Dans la fermentation du sucre, il se forme presque exclusivement des acides butyrique, acétique, carbonique, et de l'hydrogène aux dépens d'environ 42-45 p. 100 de l'hydrate de carbone. Parmi les produits secondaires de la fermentation, on peut signaler une certaine proportion de divers alcools et de traces d'acide lactique.

Le *Clostridium* se distingue facilement des autres ferments butyriques qui décomposent plus ou moins énergiquement l'amidon, le lactose, la mannite, la glycérine, le lactate de calcium et qui donnent parmi les produits de la fermentation des quantités considérables d'alcools, notamment d'alcool butylique, ce qui n'a jamais lieu avec le Microbe qui nous occupe.

Dégénérescence du « Clostridium » en cultures artificielles. — Dans les cultures artificielles, le *Clostridium* tend à dégénérer. Les bâtonnets s'allongent, se tordent, portent parfois à leurs extrémités des articles arrondis et cocciformes, ou bien ils se renflent avec exagération. En tout cas, la propriété de sporulation s'atténue de plus en plus jusqu'à ce que le Microbe soit devenu complètement asporogène. WINOGRADSKY suppose que ce phénomène est dû à ce que les gaz de la fermentation, en se dégageant, balayent l'azote gazeux qui aurait pu exister dans le milieu nutritif, et entravent ainsi le développement normal de l'organisme en présence.

Conditions de la fixation de l'azote libre par le « Clostridium » et importance de cette fixation. — On vient de voir que le *Clostridium*, placé dans un liquide qui renferme de l'oxygène, ne peut pas se multiplier, mais qu'il se développe fort bien lorsque des aérobies débarrassent de ce gaz le milieu

nutritif. La présence d'une trace d'azote combiné favorise la mise en train de la fermentation en permettant l'absorption rapide de l'oxygène par les espèces aérobies. Les débuts de culture en milieu aéré sont toujours lents, mais lorsque ce premier stade est franchi, la fermentation marche rapidement, l'acide carbonique qui se dégage entravant la pénétration de l'air à l'intérieur du liquide.

Le même phénomène rend aussi difficile l'accès de l'azote gazeux et comme il est indispensable à la vie du *Clostridium*, on y remédie en faisant barboter dans la culture un courant d'azote rigoureusement pur. Les proportions de ce gaz qui sont alors fixées atteignent des taux très élevés, surtout si on met en présence des doses suffisantes de dextrose.

C'est ainsi que WINOGRADSKY, en disposant des cultures pures de *Clostridium*, dans des vases plats de 20 centimètres de diamètre et renfermant chacun 500 centimètres cubes de la solution minérale nutritive, a obtenu les chiffres suivants :

	Glucose.	Azote fixé.	Sucre consommé.	Rapport de l'azote fixé au sucre consommé.
I.	20 grammes.	28 mgr. 87	20 grammes.	$\frac{1,4}{1\ 000}$
II.	20 —	24 mgr. 68	20 —	$\frac{1,2}{1\ 000}$

Si l'on considère les chiffres de glucose consommé, on voit nettement que c'est la destruction de ce composé qui fournit l'énergie nécessaire à la fixation et à l'organisation de l'azote gazeux par le *Clostridium*. Les résultats les plus favorables montrent qu'il faut environ 1000 parties de glucose pour fixer 1 partie 5 d'azote en cultures anaérobies ; la même quantité de glucose correspond à une fixation de 1 partie 5 à 1 partie 8 en culture aérée, ce qui peut s'expliquer en remarquant que, dans le premier cas, la destruction de la molécule de glucose n'est que partielle et qu'une partie de l'énergie de la matière sucrée est encore restée dans les produits acides formés notamment dans l'acide butyrique.

Le « *Clostridium* » possède-t-il seul la propriété fixatrice d'azote sur le sol? — On a vu précédemment que BERTHELOT¹, à la suite d'essais d'ordre chimique, a admis « qu'il existe des microorganismes d'espèces fort diverses..., aptes à fixer l'azote, spécialement certaines Bactéries du sol ». Il a eu recours alors à l'intermédiaire de GUIGNARD qui a isolé, par la méthode des plaques, une série de germes banaux de la décomposition des matières protéiques. Ces organismes ont été étudiés par BERTHELOT et deux d'entre eux auraient manifesté la propriété fixatrice.

WINOGRADSKY² a repris ces essais en plaçant dans les mêmes conditions que le *Clostridium* 15 autres espèces microbiennes extraites du sol. Il est arrivé aux conclusions suivantes :

1° Pas un de ces Microbes, auxquels il faut ajouter l'*Aspergillus* et une autre Moisissure indéterminée, qui s'est développée dans une des cultures, ne s'est montré capable d'assimiler l'azote libre. L'augmentation de l'azote constatée dans quelques cultures était très minime malgré la durée de l'expérience. Seul le *Clostridium*, protégé par d'autres Microbes, a donné lieu, dans ces cas, à des fixations importantes.

2° Les Microbes isolés par la culture sur gélatine en plaques n'ont, dans la majorité des cas, manifesté aucune tendance à l'absorption d'azote. Là où cette assimilation a été notée, elle était minime et inconstante. Ces Microbes sont d'ailleurs incapables d'utiliser le carbone en présence d'une quantité insuffisante d'azote combiné, ce qui démontre également que leur capacité de fixer l'azote est faible ou nulle.

3° Des Microbes isolés par cultures sur pomme de terre, deux, en dehors du *Clostridium*, donnaient une augmentation de l'azote en présence d'une petite quantité de cet élément combiné, mais cette fixation était trois fois moindre qu'avec le *Clostridium*.

4° Pas un des Microbes n'a pu se développer dans un milieu

1. BERTHELOT, Nouvelles recherches sur les microorganismes fixateurs d'azote, *Ann. Ph. et Ch.*, 6^e s., t. XXX, 1893, p. 419. — *Id.*, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 842.

2. WINOGRADSKY, Absorption par les microorganismes de l'azote libre de l'air, *Arch. des Sc. biol. de l'Inst. imp. de Méd. exp. de St-Petersbourg* (édit. fr.), t. III, fasc. 4, 1895, p. 297.

totalement dépourvu d'azote combiné et le *Clostridium* reste jusqu'à ce jour l'espèce unique à ce point de vue. Lui seul peut fixer l'azote en quantité suffisante pour ses besoins, depuis le commencement jusqu'à la fin de sa végétation.

WINOGRADSKY admet enfin, contrairement à l'opinion de BERTHELOT, que la faculté de fixer l'azote libre de l'air n'est pas très répandue dans le monde des Microbes et constitue une fonction spéciale d'une seule ou d'un très petit nombre d'espèces.

Les recherches de FERMI¹ donnent des résultats analogues. Parmi les microorganismes qu'on peut cultiver sur saccharose pur, cet auteur n'en a pas trouvé qui soient capables de fixer l'azote de l'air.

La question semblait donc presque résolue par la négative lorsque BEYERINCK², dans un important travail, montre que la propriété fixatrice est partagée par d'autres espèces que le *Clostridium* de WINOGRADSKY et, en particulier, par certaines Bactéries appartenant au genre *Azotobacter*.

RECHERCHES DE BEYERINCK

BEYERINCK envisage d'abord, au point de vue de leurs besoins en azote minéral, trois groupes de Bactéries :

1° Les *oligonitrophiles*, qui croissent dans les milieux privés d'azote ou très pauvres en cet élément et qui utilisent l'azote atmosphérique;

2° Les *mésositrophiles*, qui occupent dans la nutrition azotée une place intermédiaire et dont un bon type est constitué par le Microbe des nodosités des Légumineuses;

3° Les *polynitrophiles*, qui ont de grands besoins d'azote combiné pour croître normalement.

Au point de vue de leurs besoins en oxygène, les Bactéries se classeraient semblablement en *microaérophiles*, *mésaérophiles* et *macroaérophiles*.

1. FERMI, Stickstofffreie Mikroorganismen und Enzyme, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. II, 1896, p. 505.

2. BEYERINCK, Ueber oligonitrophile Mikroben, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 561.

BEYERINCK reprend alors les recherches de WINOGRADSKY, en se servant comme lui de la méthode des cultures électives, mais en opérant non plus en l'absence d'oxygène, mais en conditions strictement aérobies ou même en activant l'arrivée de l'air de manière que la fermentation butyrique soit très réduite. Il utilise à cet effet des mélanges de Bactéries dans lesquels dominent des représentants d'un genre d'oligonitrophiles non encore décrit, auquel il donne le nom d'*Azotobacter* et qui comprend actuellement deux espèces : *A. chroococcum*, retiré des terres de jardin, et *A. agilis*, rencontré dans les eaux du canal de Delft.

Comme milieux de culture, il emploie la mannite en solution à 2-10 p. 100 et les propionates de calcium, potassium et sodium en solutions à 1/2 p. 100. La mannite ne subit en effet que faiblement la fermentation butyrique et les propionates pas du tout.

Les mésonitrophiles ont été rencontrés par BEYERINCK, aussi bien dans les fermentations butyriques réduites obtenues en suivant la technique de WINOGRADSKY modifiée, que dans ses recherches sur les *Azotobacter*. Cependant, il a trouvé dans la plupart des fermentations butyriques une espèce intéressante qu'il n'a jamais remarquée dans les cultures d'*Azotobacter* sans fermentation et à laquelle il donne le nom de *Granulobacter sphaericum*, par suite de ses analogies avec les *Granulobacter* déjà connus. Cette espèce, comme toutes les autres du genre, donne des spores qui peuvent supporter la pasteurisation, propriété qui peut être mise à profit pour son extraction du sol.

BEYERINCK attribue à plusieurs de ces organismes, cultivés dans certaines conditions, le pouvoir fixateur d'azote. Aussi allons-nous donner tout d'abord leur mode d'obtention, ainsi que leurs caractères de culture qui permettront d'aborder avec plus de facilité l'étude de la fixation d'azote par leur intermédiaire.

***Azotobacter chroococcum*.** — Cet *Azotobacter* a été trouvé dans de la terre de jardin et aussi dans les eaux du canal de Delft. Ses cultures sont faciles à obtenir à l'état de pureté sur le milieu suivant :

Eau distillée.....	100 grammes.
Mannite.....	2 —
Phosphate de potasse.....	0 gr. 02
Agar.....	2 grammes.

Après 24 heures à 30°, l'*Azotobacter* se montre sous forme de petites colonies ressemblant à de l'empois d'amidon.

On peut encore l'obtenir par ensemencement avec une trace de terre de jardin d'une solution aqueuse renfermant 2 de mannite et 0,02 de phosphate de potasse pour 100 d'eau courante. Il forme alors des masses flottantes irrégulières à l'intérieur du liquide. Ces cultures peuvent encore se faire très facilement sur divers milieux, par exemple sur décoction de feuilles de pois gélatinisée, sur bouillon de viande gélatinisé, etc.

En milieu liquide, elles sont favorisées par l'addition de petites quantités de nombreuses combinaisons azotées. Les nitrates sont bien assimilés, même à la concentration de 1/1 000; les sels ammoniacaux le sont plus difficilement, l'asparagine à peu près comme les sels ammoniacaux, la peptone, très mal.

Ensemence-t-on au lieu d'*Azotobacter* en culture pure, un mélange de cette Bactérie et d'une des espèces mésonitrophiles signalées plus haut, on voit la croissance de l'*Azotobacter* s'exalter, surtout si l'on emploie des Bactéries voisines du Bacille des nodosités des Légumineuses ou ce Bacille lui-même. Dans ce cas, il se manifeste une très abondante production de mucilage.

Les caractères différentiels de l'espèce ont été précisés par VON FREUDENREICH¹.

Ce sont de gros Coccus de 3 à 5 μ de diamètre, pouvant prendre une forme allongée (3-6 μ sur 2-3 μ) et renfermant 3-4 corpuscules réfringents déjà signalés par BEYERINCK.

Cette apparence cocciforme se rencontre surtout dans les jeunes cultures où l'on remarque d'ailleurs qu'un petit nombre d'individus se meuvent grâce à un cil vibratile. Dans les vieilles membranes, on trouve des Microcoques de grandeur très

1. VON FREUDENREICH, Ueber Stickstoffbindende Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 514.

variable, souvent groupés à la manière des Sarcines et possédant des parois mucilagineuses; ces formes âgées sont brunes ou noires.

CULTURES SUR GÉLATINE. — Croissance en 4-5 jours à 20°. Les colonies sont-elles nombreuses, elles sont très petites, rondes, jaunes et grenues. Sont-elles plus rares, elles sont plus grosses, rondes, jaune brun, pas plus grenues. Les cellules sont rondes, de 1 1/2 à 2 μ de diamètre; elles peuvent

devenir ovales ou piriformes (4 μ sur 2-3 μ). En piqure, la croissance est très maigre le long de la ligne d'ensemencement.

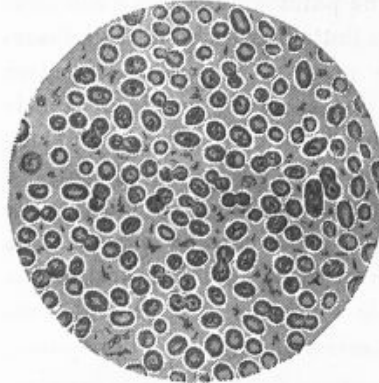


Fig. 3. — *Azotobacter chroococcum* Bey. — G. = 1000.
(D'après BEYERINCK.)

CULTURES SUR GÉLOSE-MANNITE. — A 30°, les colonies sont rondes, blanches, avec une partie centrale sombre, paraissant fréquemment formée d'anneaux concentriques. Ces colonies brunissent avec le temps. Elles ferment un mélange de cel-

lules rondes de 4-5 μ de diamètre et de très nombreuses cellules allongées de 3-6 μ sur 2-3 μ , contenant 3-4 corpuscules réfringents.

CULTURES SUR D'AUTRES MILIEUX. — Sur gélose ordinaire, la culture est très maigre et les Bactéries affectent de plus petites dimensions. Sur pomme de terre et bouillon, on ne note aucun développement et l'emploi de ce dernier milieu peut servir d'excellent moyen de contrôle de pureté pour le Microbe, toute impureté étant décelée par un trouble, ainsi que l'ont montré GERLACH et VOGEL.

L'*Azotobacter chroococcum* pousse bien sur blocs de plâtre imprégnés de solution de mannite. Il se développe bien entre 20 et 37°. Au delà de cette dernière température, les formes allongées se multiplient et il apparaît de nombreux filaments remplis de corpuscules réfringents et pouvant atteindre 10-14 μ . En vieilles cultures, ces filaments sont rares.

L'*Azotobacter chroococcum* paraît très répandu dans le sol.

Azotobacter agilis. — Cette espèce a été trouvée dans le canal de Delft avec l'*Azotobacter chroococcum*; elle n'a jamais été rencontrée dans la terre de jardin. On peut l'isoler en belles cultures dans la solution suivante :

Eau de fossé.....	100 grammes.
Mannite.....	2 —
Phosphate de potasse.....	0 gr. 02

en partant de l'eau du canal non pasteurisée.

L'*Azotobacter agilis*, de même que l'*A. chroococcum*, peut

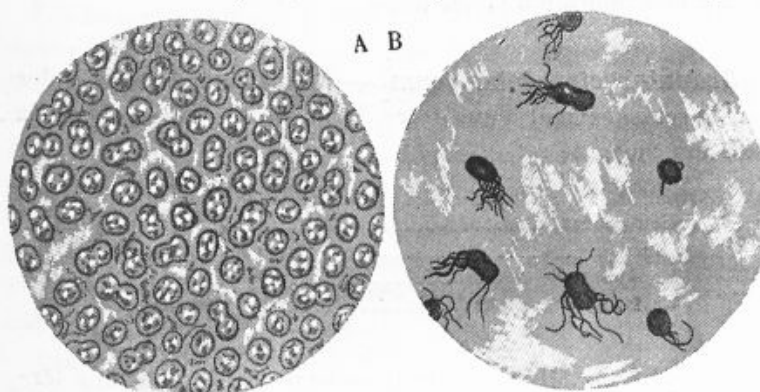


Fig. 4. — *Azotobacter agilis*. — A, préparation simple; B, préparation de cils. — G. = 1000. (D'après BEYERINCK et VAN DELDEN.)

assimiler un grand nombre de corps organiques; BEYERINCK a obtenu de bons résultats avec le sucre de canne et d'autres matières sucrées en solution à 2 p. 100. Dans d'autres cas, il a observé de beaux voiles avec 1/2 p. 100 de lactate ou d'acétate de calcium. L'alcool à 2 p. 100, comme aliment carboné, a donné lieu à de riches cultures. Avec les propionates et les succinates, les résultats ont été moins satisfaisants.

Les cultures pures de l'*Azotobacter agilis* se font sans difficulté sur le milieu suivant :

Eau distillée.....	100 grammes.
Agar.....	2 —
Glucose.....	2 —
Phosphate de potasse.....	0 gr. 02

Vient-on à remplacer le glucose par 2 p. 100 de propionate de calcium, on voit apparaître, au bout de quelque temps, autour des colonies une belle fluorescence vert jaune.

C'est une belle et grande Bactérie, rappelant l'aspect de petites Monades, très mobile, au moyen de paquets de cils, montrant fréquemment une paroi, un protoplasma, un noyau, des granulations et des vacuoles bien nets.

A l'état pur, on peut la cultiver sur les milieux les plus divers. Elle ne liquéfie pas la gélatine. Sur glucose-agar, de même que sur les milieux pauvres en azote, le développement de la Bactérie occasionne, sur les vieilles cultures, la production d'une coloration violet foncé.

Granulobacter sphœricum. — Cette Bactérie peut s'isoler par ensemencement d'une terre de jardin pasteurisée dans la solution suivante :

Eau courante.....	100 grammes.
Glucose.....	2 —
Phosphate de potasse.....	0 gr. 02
Carbonate de chaux.....	2 grammes.

maintenue à 30°. Il se manifeste au bout de 2-3 jours une fermentation qui se décèle par une odeur d'alcool éthylique ou propylique. Cette fermentation est le fait du *Granulobacter* dont une partie des éléments se présente sous l'apparence de Clostridies de 1-2 μ avec spores allongées, placées excentriquement et dont le reste affecte la forme normale des *Clostridium*, allongée, avec spore excentrique située dans la région épaissie. Les spores sont petites, de 0,3 à 0,5 μ . Toutes ces cellules se colorent en bleu par l'iode.

On peut obtenir le *Granulobacter* à l'état pur sur le milieu ci-dessus solidifié, parce que le ferment butyrique n'y pousse pas. Au contraire, sur les milieux usuels riches en azote combiné, le *Granulobacter* ne se développe pas.

Cet organisme est microaérophile, quoique à un moindre degré que le ferment butyrique, puisqu'il peut se multiplier sur milieux solides en surface.

Fixation de l'azote par les Bactéries oligonitrophiles. —

Ce phénomène a été étudié pour la première fois par BEYERINCK et VAN DELDEN¹. Remarquant que l'*Azotobacter chroococcum*, en culture pure et dans les solutions pauvres en azote, non seulement ne donne pas lieu à une fixation considérable, mais que sa croissance et sa multiplication s'arrêtent bientôt, quoique le carbone utilisable soit encore loin d'être épuisé, ces auteurs pensent qu'il faut chercher dans une symbiose avec d'autres Microbes la cause du développement de l'*Azotobacter chroococcum* et de la fixation d'azote observée dans les cultures impures.

Les formes symbiotiques pour l'*A. chroococcum* devaient selon toutes probabilités appartenir à l'un des deux groupes : sporogènes, du genre *Granulobacter*; asporogènes, parmi lesquelles deux formes principales ont été étudiées, l'une connue, *Aerobacter aerogenes*; l'autre, très polymorphe, non encore décrite et que BEYERINCK désigne sous le nom de *Bacillus radiobacter*.

BEYERINCK et VAN DELDEN emploient, en vue d'obtenir une importante fixation d'azote libre les deux procédés suivants : 1° le procédé des cultures très impures; 2° le procédé des cultures faiblement impures.

Les cultures très impures ont été effectuées en maintenant à 23-28° une solution aqueuse de mannite à 2 p. 100 additionnée de 0,05 p. 100 de phosphate de potasse, disposée dans des fioles d'ERLENMEYER etensemencée avec de la terre fraîche de jardin. Au bout de trois jours, on obtient une culture bactérienne où l'*Azotobacter chroococcum* domine. Après deux repiquages, la plupart des impuretés sont disparues; cependant, il reste encore quelques espèces fluorescentes. Ensemence-t-on alors une solution aqueuse de 2 p. 100 de glucose et de 0,05 p. 100 de phosphate de potasse, on obtient le mélange : *A. chroococcum* + *Granulobacter* (en nombreuses espèces) + *B. radiobacter*. On remarque avec ce mélange une fixation de 7 milligrammes d'azote par gramme de sucre assimilé, mais on ne peut pousser plus loin l'expérience avec la même solution de glucose, par suite de la production par les

1. BEYERINCK et VAN DELDEN, Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 3.

Bactéries fluorescentes de substances acides qui ralentissent le développement.

Repasse-t-on alors sur la mannite, ou emploie-t-on la méthode des cultures alternatives en donnant comme aliment carboné des acétates qui ne peuvent être assimilés par le *Granulobacter*, il reste la combinaison : *A. chroococcum* + *B. radiobacter* qui fixe environ 4 milligrammes d'azote par gramme de mannite consommée. Cependant si le *Granulobacter* ne peut plus exister dans le mélange, on y trouve encore des Bactéries fluorescentes et aussi, en quantité sensible, de l'*Aerobacter aerogenes* et du *Coli*.

Le procédé des cultures faiblement impures nécessite l'emploi d'un milieu composé de :

Eau courante.....	100 grammes.
Glucose.....	2 —
Craie.....	2 —
Phosphate de potasse.....	0 gr. 05

que l'onensemence avec un mélange d'*Azotobacter chroococcum* et de terre pasteurisée et qu'on maintient à 23-28°. Après réensemencements convenables, on se trouve en présence de la combinaison fixatrice : *A. chroococcum* + *Granulobacter* (en nombreuses espèces) + (comme impuretés) quelques autres espèces sporogènes accessoires. La plus grande fixation, avec de telles associations, a été observée avec un mélange d'*A. chroococcum* et de l'espèce aérobie, mais microaérophile, *Granulobacter reptans* (5 mgr. par gramme de sucre).

En dehors de ses propriétés fixatrices, l'*Azotobacter chroococcum* peut agir dans le sol comme dénitrifiant en transformant les nitrates et les nitrites en ammoniaque.

Ainsi donc, BEYERINCK et VAN DELDEN posent en principe que la fixation de l'azote sur le sol n'est pas le résultat de l'action d'un organisme isolé, mais bien de la symbiose de deux organismes. Tandis que l'*Azotobacter* seul est incapable d'aucune assimilation et que les *Granulobacter* et le *Bacillus radiobacter* se comportent de même, les cultures mélangées d'*Azotobacter* et de l'une des autres espèces provoquent le phénomène avec une énergie assez grande, quoique variable suivant la nature de l'association.

Cette manière de voir est adoptée par CHESTER¹, mais elle trouve des contradicteurs en la personne de GERLACH et VOGEL² qui pensent que la propriété de fixer l'azote libre est liée aux conditions de nutrition et de vitalité des Bactéries et que chacune de celles-ci n'exerce son action qu'en présence d'un aliment hydrocarboné tel que le glucose, les propionates, etc.

Pour le prouver, ils disposent dans des fioles d'ERLENMEYER 1 000 centimètres cubes d'une solution nutritive contenant de faibles proportions de potasse, chaux et acide phosphorique. Plusieurs de ces fioles reçoivent en outre 10 grammes de glucose, puis trois fioles sucrées et trois non sucrées sontensemencées avec de l'*Azotobacter* pur et les autres sont gardées comme témoins. Après culture, l'analyse des liquides a donné les résultats suivants :

	Milligrammes d'azote par fiole		
	après 45 jours.	62 jours.	67 jours.
Trois fioles avec glucose,ensemencées . . .	28,7	49,0	41,4
— sans — . . .	1,8	2,2	2,2
Deux fioles avec glucose, nonensemencées.	»	»	$\left\{ \begin{array}{l} 2,8 \\ 2,5 \end{array} \right\} 2,7$

Ce qui montre que l'absence de glucose arrête toute fixation. Par contre, avec les cultures âgées, l'addition de fortes proportions de ce sucre diminue le pouvoir fixateur. Ce pouvoir est d'ailleurs maximum pour les cultures extraites du sol depuis peu.

La fixation par l'*Azotobacter* en cultures pures est confirmée par VON FREUDENREICH³. Cependant, d'après cet auteur, le phénomène en milieu liquide est toujours peu important, alors qu'il l'est davantage sur blocs de plâtre.

1. CHESTER, Oligonitrophile Bodenbakterien, *Delaware Agric. Exper. Station.*, Résumé dans *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 382.

2. GERLACH et VOGEL, Stickstoffansammelnde Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VIII, 1901, p. 669. — Id., Weitere Untersuchungen mit Stickstoffbindende Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 817, 881; t. X, 1903, p. 636.

3. VON FREUDENREICH, Ueber Stickstoffbindende Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 514.

Relations de l'« Azotobacter » avec les aliments minéraux inorganiques. — GERLACH et VOGEL ont montré que la chaux et l'acide phosphorique sont des aliments très utiles pour les Bactéries du groupe *Azotobacter*. L'absence de potasse et de soude ne modifie pas la croissance et le pouvoir assimilateur de ces Bactéries.

Action des Levures et des Moisissures sur le développement des Bactéries du groupe « Azotobacter ». — Au cours de leurs isolements d'*Azotobacter chroococcum*, GERLACH et VOGEL ont trouvé dans quelques-unes de leurs cultures des organismes étrangers, savoir : une Moisissure formée de longs filaments feutrés en masses blanchâtres, portant des spores gris verdâtre et colorant le liquide en rouge-cerise ; une Levure blanche ; un *Streptothrix*. Ces trois organismes furent isolés à l'état de pureté et ajoutés séparément à des cultures d'*Azotobacter chroococcum* sur le milieu suivant :

Eau distillée.....	1 000 centimètres cubes.
Glucose.....	8 grammes.
Phosphate bicalcique.....	0 gr. 50
Chlorure de sodium.....	0 gr. 50
Carbonate de chaux.....	0 gr. 50
Sulfate de fer.....	traces.

Des dosages répétés d'azote dans les diverses cultures ont montré que le pouvoir fixateur de l'*Azotobacter* était très sensiblement diminué par cette addition.

Mécanisme de la fixation de l'azote sur le sol par les Bactéries. — Déjà en 1890, LÆW¹ s'était demandé si la fixation de l'azote sur le sol ne relèverait pas d'une action catalytique analogue à celle qu'exerce la mousse de platine et dont l'élément occasionnel serait le protoplasma des cellules vivantes agissant en milieu faiblement alcalin.

1. LÆW, Bildung von Salpetrigsäure und Ammoniak aus freiem Stickstoff, *Ber. d. d. Chem. Ges.*, t. XXIII, 1890, p. 1443.

SCHULZE¹, puis BONNEMA² sont revenus dernièrement sur cette question.

Ce dernier auteur, notamment, reprend certaines idées émises par HILTNER et STÖRMER³ dans un récent mémoire sur les Bactéroïdes des Légumineuses et il les applique aux organismes du groupe *Azotobacter*. En général, l'action et l'activité des Azotobactéries sont considérablement influencées par certaines combinaisons telles que le sucre, l'amidon, les matières pectiques, les produits de décomposition de la cellulose, les acides lactique et humique, l'asparagine et surtout par les sels terreux comme le carbonate de chaux, le gypse, etc. Un rôle important est joué par la régularité de la température ainsi que par la présence de certaines combinaisons du fer. Or on sait que le fer est considéré aujourd'hui comme un des éléments indispensables à l'action des enzymes. Il y a donc lieu de se demander si l'on n'est pas ici en présence d'une action analogue.

Cette question, posée depuis peu, n'a pas encore reçu de solution satisfaisante. En tout cas, BEYERINCK et VAN DELDEN⁴ admettent que, dans l'assimilation de l'azote par les Bactéries, il se forme une combinaison azotée soluble qui diffuse hors des organismes actifs et se répand dans le sol où elle se trouve à la portée des autres Bactéries ou des plantes plus élevées.

1. SCHULZE, Seradella und Kalk, *Deutsche landw. Presse*, t. XXIX, 1902, p. 822.

2. BONNEMA, Gibt es Bakterien die dem freien Stickstoff assimiliren, oder ist dies ein chemischer Process? *Chem. Zeit.*, t. XXVII, 1903, p. 148.

3. HILTNER et STÖRMER, Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger, *Arb. a. d. biol. Abt. d. k. Ges. Amtes*, t. III, 1903, p. 151, 307.

4. BEYERINCK et VAN DELDEN, Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 3.



CHAPITRE III

Fixation de l'Azote par l'intermédiaire de l'Alinite.

En 1897, un cultivateur allemand, CARON, d'Ellenbach, faisait connaître qu'il avait été amené à isoler du sol une Bactérie capable de fixer l'azote de l'air au profit des céréales. Les cultures pures de cette Bactérie ont été préparées en grand par une fabrique d'Elberfeld et mises en vente comme engrais sous le nom d'*Alinite*.

L'auteur donna à la Bactérie fixatrice le nom de *Bacillus Ellenbachensis* ¹. Il fit des expériences à la suite desquelles il annonça qu'en inoculant ce Bacille à des semences de céréales, on obtient un excédent considérable de récolte. Des résultats analogues auraient été obtenus avec la Moutarde.

Le procédé d'inoculation est très simple : il consiste à diluer les cultures dans une quantité suffisante d'eau et à en imbiber les semences avant de les enfouir.

Cette découverte inattendue eut un grand retentissement en Allemagne et les diverses stations agronomiques des pays germains se mirent à étudier l'alinite pour en fixer la valeur.

D'autre part, de nombreux expérimentateurs parmi lesquels on peut citer STUTZER et HARTLEB ², LAUCK ³, KOLKWITZ ⁴,

1. CARON, Landwirtschaftlich-bakteriologische Probleme, *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1895, p. 401.

2. STUTZER et HARTLEB, Untersuchungen über das im Alinit enthaltene Bakterium, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 31, 73.

3. LAUCK, Welches sind die Bestandteile des als "Alinit" bezeichneten Impfdüngers für Saatgetreide...? *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 290.

4. KOLKWITZ, Beiträge zur Kenntniss der Erdbakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 670.

FRANK¹, HARTLEB², etc., essayèrent d'identifier le Bacille de CARON avec les espèces microbiennes existant déjà.

C'est ainsi que STUTZER et HARTLEB montrent que c'est un Microbe à spores endogènes, long de 2 à 3 μ , large de 1 à 1,2 μ , aérobic, en articles isolés ou réunis en filaments, liquéfiant la gélatine et croissant sur les milieux habituels. Ils pensent que ce Microbe est voisin des *B. mycoides* et *B. megaterium*. D'après LAUCK, il ne serait autre que le *B. subtilis* et d'après FRANK le *B. terrigenus*.

STOKLASA³ identifie le Bacille d'Ellenbach avec le *Bacillus megaterium*. Il recherche ensuite avec ses collaborateurs, LAXA et DUCHACEK, si, comme CARON l'a affirmé, ce Bacille est bien un fixateur d'azote. Ces expériences conduisent à un résultat affirmatif. Elles montrent en outre que le *B. megaterium* est aérobic et dénitrifiant; mais il possède de plus à un haut degré la propriété de solubiliser énergiquement l'azote des matières organiques : cultivé sur fibrine et nucléine, il a solubilisé en 72 jours 22 p. 100 de l'azote total. Le phénomène s'accompagne de la production d'acides amidés de la série grasse; le soufre passe à l'état d'acide sulfurique.

Cette action se manifeste avec une grande énergie vis-à-vis des matières organiques de la tourbe; l'expérience a montré que, dans une tourbe dosant 0,83 p. 100 d'azote total, le Bacille avait transformé, au bout de 72 jours, 42 p. 100 de cet azote en composés solubles dans l'eau et probablement assimilables par les plantes.

STOKLASA suppose que le *Bacillus megaterium*, exerçant cette curieuse propriété aux dépens des matières organiques du sol les amène rapidement à l'état assimilable et tend ainsi à faciliter l'alimentation des plantes et par suite à augmenter les récoltes. Outre cette solubilisation, le Bacille agirait encore en fixant de l'azote.

1. FRANK, Ueber Bodenimpfung mit stickstoffsammelnden Bakterien. — *Jahrb. d. D. Land. Ges.*, t. XIII, 1898.

2. HARTLEB, Ueber Alinit und den *B. Ellenbachensis* α , *Bot. Centralbl.*, t. LXXII, 1897, p. 229. — ID., Repräsentirt das Alinit Bakterium eine selbständige Art? *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 706.

3. STOKLASA, Was ist Alinit? *Chemiker Zeitung*, t. XXII, 1898, p. 181. Voir aussi : Biologische Studien über Alinit, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 39, 78, 119, 284, 507, 535.

Les résultats obtenus par d'autres auteurs ne s'accordent pas tous avec ceux de STOKLASA. D'après FRANK, le Bacille de l'alinite détruit les nitrates, mais ne fixe pas d'azote. WAGNER¹ n'a pas, lui non plus, observé de résultats positifs avec des doses massives d'alinite employées sur des cultures d'orge et d'avoine dépourvues d'azote : les plantes ont présenté les symptômes décrits autrefois par cet auteur sous le nom de faim d'azote.

STUTZER et HARTLEB², puis LAUCK³ concluent de leurs essais que le Bacille de CARON se comporte comme une Bactérie de la putréfaction, en ce sens qu'il décompose les albuminoïdes. Ainsi l'albumine de l'œuf est liquéfiée; il se forme des peptones, des amines, de l'ammoniaque et accessoirement de l'azote libre, mais jamais de nitrates ou de nitrites.

Les mêmes résultats négatifs sont obtenus par KRÜGER et SCHNEIDEWIND⁴, soit dans des essais de laboratoire, soit dans la grande culture. Par contre, LUTOSLAWSKI⁵ observe de meilleurs rendements ainsi que STOKLASA et VITEK⁶.

DEHÉRAIN⁷ n'obtient avec l'alinite que des résultats nuls ou discutables. Il pense que la cause de ces échecs doit résider dans la présence constante dans le sol des ferments dont les propriétés peuvent être mises à profit par les cultivateurs et dont l'addition nouvelle devient dès lors inutile.

Il convient en outre de remarquer que la fixation de l'azote atmosphérique n'a lieu, comme l'a montré BERTHELOT, que par destruction de matières organiques et, dans quelques expériences exécutées par DEHÉRAIN, on a trouvé que cette fixation présentait une certaine régularité.

1. WAGNER, Düngringsfragen, Heft IV, 1898.

2. STUTZER et HARTLEB, Untersuchungen über das im Alinit enthaltene Bakterium, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 31, 73.

3. LAUCK, Wissenschaftliche und praktische Studien über Entstehung der beiden Impfdünger Nitragin und Alinit, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 20, 54, 87.

4. KRÜGER et SCHNEIDEWIND, Untersuchungen über Alinit, *Landw. Jahrb.*, 1899, p. 579.

5. LUTOSLAWSKI, Zwei Versuche mit Alinit, *Deutsche landw. Presse*, t. XXV, 1898, p. 920.

6. STOKLASA et VITEK, Die Stickstoffassimilation durch die lebende Bakterienzelle, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1899, p. 257.

7. DEHÉRAIN, L'ensemencement des ferments du sol, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 174.

Ce dernier auteur pense que le résultat de l'altération progressive de la matière organique végétale dans le sol est de donner de l'humus qui convient certainement à l'alimentation des Bactéries puisque le sol des prairies s'enrichit lentement. Or cet humus existe dans toutes les terres; il semble donc que l'on doive chercher à introduire dans le sol les substances nutritives pour les Bactéries et à déterminer rigoureusement les conditions de leur développement plutôt que d'ajouter à ce sol de nouveaux ferments. En effet, quand les conditions se sont trouvées favorables à l'activité de l'alinite, elle a fixé de l'azote; quand, au contraire, ces conditions n'ont pas été remplies, les effets ont été nuls, et ceci explique les divergences constatées entre les résultats de CARON et de STOKLASA d'une part, de FRANK, STUTZER et WAGNER de l'autre.

STOKLASA¹ se range à la manière de voir de DEHÉRAIN. Il émet l'opinion que les hydrates de carbone, principalement les pentoses (xylose, arabinose), $C^5H^{10}O^5$, jouent un rôle capital dans le développement du *Bacillus megaterium*. Or, dans le sol, les pentoses se forment par hydratation des substances furfurogènes qui proviennent en abondance des débris des récoltes. Il est dès lors intéressant de constater que la présence des pentoses détermine la fixation de l'azote sur le sol, mais aussi et parallèlement, une dénitrification importante, et cela expliquerait pourquoi la tourbe, le sol forestier et celui des prairies ne contiennent pas de nitrates, tandis que l'azote organique y atteint des taux très élevés.

Les hydrates de carbone les plus avantageux à introduire dans le sol seraient donc les pentoses.

De son côté, MALPEAUX², voulant contrôler les résultats discordants obtenus par l'emploi de l'alinite, a inoculé avec cette substance des graines de Blé, d'Orge et d'Avoine qui ont été semées deux jours plus tard en plein champ et dans des pots. Les récoltes ont été pesées et comparées entre elles et avec des récoltes faites dans les mêmes conditions sans alinite.

1. STOKLASA, Nouvelles recherches biologiques sur le Bacille megaterium. Alinite. Lettre à DEHÉRAIN, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 253.

2. MALPEAUX, Emploi de l'alinite dans la culture des céréales, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 482.

On a constaté ainsi que, dans du sable siliceux stérile, l'alinite n'exerce aucun effet sensible sur la récolte en céréales. La fixation de l'azote ne semble avoir lieu que par destruction de matières organiques, ce qui montre que dans les terres riches en humus, l'intervention du *Bacillus megaterium* paraît devoir être avantageuse. Enfin, dans une terre arable ordinaire, l'apport d'alinite n'exerce pas d'influence bien marquée sur le rendement, ce qui confirme la manière de voir de DEHÉRAIN.

GRANDEAU¹ fait connaître des résultats analogues en terre riche. Il a obtenu sur de l'Avoine alinitée des gains de 45 p. 100 en grains et de 73 p. 100 en paille.

GAIN² observe aussi des augmentations de récolte assez notables avec du Lin et du Sarrasin.

STOKLASA³ revient l'année suivante sur le rôle fixateur de l'alinite en présence des pentosanes. Il constate que ces dernières substances sont réfractaires à la plupart des actions microbiennes, mais cependant elles sont facilement attaquées par le Microbe de l'alinite et forment même la base de son alimentation. En milieu favorable, par exemple un mélange de 1 partie de glucose pour 31 parties de xylose additionné d'une petite quantité de peptone représentant 0,5 d'azote organique p. 100 de xylose, la quantité d'azote fixé peut atteindre jusqu'à 0,152 p. 100 du poids du xylose.

Or les pentosanes se trouvent en quantités très variables dans les différents sols. Les expériences de STOKLASA montrent que dans des terres pauvres en ces substances, enrichies artificiellement, l'emploi de l'alinite a toujours été suivi de succès et on a pu noter des augmentations de récolte allant jusqu'à 50 p. 100.

MALPEAUX⁴ fait alors une nouvelle série d'essais en envisageant la question sous cette dernière face. Il montre qu'en

1. GRANDEAU, *Jnal d'Agric. pratique*, 1898.

2. GAIN, Influence des microbes du sol sur la végétation, *Rev. gén. de Bot.*, t. XI, 1899, p. 18.

3. STOKLASA et SEMPOLOWSKI, Versuche mit Nitragin und Alinit, *Deutsche landw. Presse*, 1899, p. 13.

4. MALPEAUX, L'alinite dans la culture des céréales, *Ann. agr.*, t. XXVI, 1900, p. 196.

terrain siliceux, l'alinite seule ne donne pas d'accroissement notable de récoltes. Employée simultanément avec des substances hydrocarbonées, ses effets ont été plus marqués, sans cependant être absolument favorables. En terreau de jardin, l'imprégnation des semences avec l'alinite a donné des résultats avantageux. Par contre, dans les terres arables ordinaires renfermant une proportion moyenne d'humus, son emploi n'a été suivi d'aucun succès. Enfin, dans les sols riches en matières organiques, l'alinite produit des effets favorables, mais bien inférieurs cependant à ceux fournis par le nitrate de soude.

Dans un nouveau travail présenté à la Société d'Agriculture allemande, STOKLASA¹ montre, par quelques exemples, que l'addition aux terres cultivées d'espèces microbiennes très répandues : *Bacillus mycoides*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. subtilis*, *B. butyricus*, *B. megaterium*, *B. ureæ*, *B. mesentericus*, *B. coli*, *Proteus vulgaris*, en augmente les récoltes d'une manière sensible. Ces Microbes sont capables en effet de transformer dans le sol l'azote organique en sels ammoniacaux, mais de tous, le *B. megaterium* est le plus actif.

Mais le point le plus important de cette communication est le suivant : STOKLASA dit avoir isolé un nouveau Microbe associé au *Bacillus megaterium* et sans lequel l'alinite ne pourrait fixer dans le sol l'azote atmosphérique. L'action de l'alinite, dans les cas les plus favorables, est en effet double : il y a solubilisation des matières azotées du sol d'une part, ce qui serait le fait du *B. megaterium*, et fixation d'azote libre d'autre part, grâce au nouveau Microbe.

Ce Microbe a été isolé d'une terre humifère et son origine explique, d'après STOKLASA, les résultats contradictoires des essais entrepris avec l'alinite. Le mode opératoire indiqué par CARON n'apportait, en effet, qu'un seul des Microbes et il fallait que l'autre se trouvât dans le sol, ce qui est une conséquence de sa richesse en matières organiques. Aussi STOKLASA conseille-t-il de préparer dorénavant l'alinite en arro-

1. STOKLASA, Ueber neue Probleme der Bodenimpfung, *Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Oesterreich*, t. III, 1900, p. 440; *id.*, *Deutsche landw. Presse*, 1900, p. 189.

sant de la terre avec un mélange de mélasse et de *B. megaterium* et en laissant ce mélange à l'air, à l'abri de la lumière vive, pour assurer sa contamination par le second Microbe. Au bout d'un mois, on répand dans les champs, un peu avant les semailles.

Comme suite à cette communication, MALPEAUX¹ fait de nouvelles expériences sur l'Avoine, le Maïs-fourrage et la Moutarde blanche, en suivant le mode opératoire préconisé par STOKLASA. Les résultats de ces recherches confirment ceux des essais précédents, à savoir que l'alinite agit seulement dans les milieux riches en matières organiques.

Mentionnons enfin les résultats négatifs obtenus par SEWERIN² dans des inoculations comparatives effectuées avec deux races de *Bacillus megaterium* et une variété du Bacille d'Ellenbach.

En résumé, si l'on examine les résultats des expériences de grande culture, on est tenté d'admettre que les contradictions observées tiennent probablement à ce que toutes les conditions essentielles de la végétation en présence de l'alinite n'ont pas été remplies.

D'autre part, les excédents de récolte obtenus par STOKLASA ne suffisent pas à prouver que les effets de l'alinite soient dus à une fixation de l'azote atmosphérique libre. L'abondance des rendements, observée en sols riches seulement, au cours des essais conduits avec beaucoup de soin par MALPEAUX, concordant avec le rôle destructeur des matières organiques reconnu au *Bacillus megaterium* par STUTZER et HARTLEB, LAUCK et STOKLASA lui-même, tendent à faire penser que l'action favorable de cet organisme est due plutôt à ce que sa pullulation favorise la décomposition des substances azotées complexes et leur transformation en composés plus simples, parmi lesquels figurent les sels ammoniacaux et les amines. Or on sait, depuis les travaux de MUNTZ pour les sels ammoniacaux, de LUTZ et de CZAPEK, pour les amines, que ces corps

1. MALPEAUX, Nouvelles recherches sur l'inoculation du sol avec l'alinite, *Ann. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 191.

2. SEWERIN, Ein Beitrag zur Alinitfrage, *Centralbl. f. Bakt.*, 3 Abt., t. IX, 1902, p. 712, 746.

peuvent fort bien être assimilés par les plantes, pourvu que leur poids moléculaire ne soit pas trop élevé.

Il y aurait lieu, nous semble-t-il, de ne pas abandonner l'étude de l'alinite. Si, comme le pense MAZÉ¹, il est d'une utilité contestable d'introduire dans le sol un Microbe aussi répandu que le *Bacillus megaterium*, alors qu'il serait plus simple d'exalter sa vitalité par l'addition de fumures organiques et particulièrement de fumier de ferme, il n'en est pas moins intéressant de préciser l'action exacte du ferment et de voir si son rôle se borne réellement à une simplification moléculaire de l'azote combiné complexe, ou s'il s'y joint une fixation réelle.

En tout cas, au point de vue de la grande culture, il semble bien que l'alinite ne réponde pas entièrement aux espérances qui avaient accompagné son apparition.

1. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XIII, 1899, p. 145.

CHAPITRE IV

Conditions générales de la fixation directe de l'Azote par le sol. — Influence de diverses substances minérales sur ce phénomène et sur la conservation de l'Azote fixé.

BERTHELOT¹ a montré que les conditions qui favorisent l'absorption de l'azote sont celles qui permettent la circulation des gaz atmosphériques dans l'épaisseur du sol, telles que : la porosité de la terre, limitée d'ailleurs afin que la circulation de l'air n'y soit pas trop active ; la présence d'une dose assez réduite d'humidité (2-3 p. 100 à 15 p. 100) ; la présence de l'oxygène en même temps que de l'azote ; un volume d'air égal à 30-40 fois au moins le volume du sol ; une température supérieure à 10° et inférieure à 40°. Enfin, l'oxydation ne doit pas être trop activée et poussée jusqu'à la nitrification et la terre ne doit pas être disposée en couche mince, mais sur une épaisseur notable afin que la circulation des gaz oxydants n'y soit pas trop rapide, celle-ci faisant périr les Microbes ou altérant les principes azotés.

JOULIE² pense que la composition du sol et des engrais exerce sur le phénomène une influence bien plus notable que le développement de la végétation. L'addition de chaux et de calcaire agirait au plus haut degré sur cette fixation ; l'absence

1. BERTHELOT, Sur quelques conditions générales de la fixation de l'azote par la terre végétale, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XIV, 1888, p. 473.

2. JOULIE, Fixation de l'azote dans le sol cultivé, *Ann. agr.*, t. XII, 1886, p. 5.

de potasse et d'acide phosphorique entraverait la marche du phénomène; l'argile ne serait pas indispensable.

PICHARD¹ n'est pas du même avis en ce qui concerne l'argile. Il a fait à cet égard des expériences dans lesquelles il ne sépare pas, il est vrai, la fixation de l'azote de la nitrification subie par cet élément, mais qui n'en constituent pas moins une intéressante contribution à l'étude de la fixation.

Dans un précédent travail², PICHARD avait étudié l'action nitrifiante comparée de quelques substances contenues naturellement ou ajoutées dans les terres végétales. Il avait constaté que les sulfates, notamment le sulfate de chaux, favorisent grandement la nitrification et il avait établi une échelle de comparaison des pouvoirs nitrifiants de divers sels rapportés à celui du sulfate de chaux.

Il a étendu cette étude à des sables mélangés d'argile en proportions diverses, en la bornant à l'action du plâtre et, accessoirement, à celle du chlorure de sodium.

Un mélange de plâtre et de tourteau d'arachides décortiquées a été ajouté : 1° dans un sable à gros grains, 2° dans un sable fin. Les sols ainsi préparés ont été placés dans des vases d'environ trois litresensemencés avec une délayure de terre et abandonnés à l'air à l'abri des poussières.

Dans des sables siliceux presque purs additionnés de tourteaux à la dose de 1 gramme par kilo, pourvus de ferments nitriques et maintenus très humides et exempts de végétation pendant dix-huit mois, la déperdition d'azote a été considérable et s'est élevée jusqu'à 70 p. 100. Elle a été plus grande dans les sables grossiers que dans les sables fins. Les quantités d'acide azotique et d'ammoniaque trouvées à la fin de l'expérience sont faibles et n'atteignent pas 15 p. 100 de l'azote initial.

L'addition de plâtre à la dose de 5 grammes par kilo a, dans les mêmes conditions, réduit la perte d'azote à 58 p. 100 au maximum et cet azote conservé se retrouve à l'état d'ammo-

1. PICHARD, Influence dans les terres nues du plâtre et de l'argile sur la conservation de l'azote, sur la fixation de l'azote atmosphérique et sur la nitrification, *Ann. agr.*, t. XV, 1889, p. 505. — *Id.*, *C. R.*, t. CXIX, 1889, p. 445.

2. PICHARD, Action nitrifiante comparée de quelques sels contenus naturellement ou ajoutés dans les terres végétales, *C. R.*, t. XCVIII, 1884, p. 1289.

niaque et d'acide azotique. L'effet de conservation et de nitrification est plus marqué dans les sols à éléments fins offrant des conditions d'aération et d'humidité plus favorables à la nitrification.

Or, on sait que, dans le sol, l'azote organique se transforme d'abord en ammoniacque qui, si les conditions de nitrification active font défaut, se dégage sous cette forme ou sous celle de carbonate d'ammoniacque. Le sulfate de chaux retient l'ammoniacque à l'état de sulfate d'ammoniacque et contribue indirectement à la production d'acide nitrique en conservant l'azote sous une forme facilement nitrifiable. Le rôle du sulfate de chaux ne paraît pas se borner là; il semble participer au phénomène de la nitrification en vertu d'une action encore mal connue.

CHLORURE DE SODIUM ET PLÂTRE. — La présence de chlorure de sodium à la dose de 1 p. 1000 n'entrave pas l'action du plâtre. Elle est même favorable en entretenant, grâce à l'hygroscopicité du sel un peu plus d'humidité. A partir d'une certaine dose que l'auteur n'a pas déterminée, le sel, par ses propriétés antifermentescibles, devient nuisible.

ARGILE SEULE. — L'incorporation de l'argile pure, à la dose de 10 p. 100 dans les sables non plâtrés maintenus dans les conditions précitées réduit notablement la perte d'azote. L'accroissement d'acide nitrique n'a été marqué que pour le sable à gros éléments auquel l'argile a donné un peu plus de cohésion et d'hygroscopicité. Il y a eu diminution d'acide nitrique pour le sable fin, mais les quantités d'ammoniacque ont augmenté dans les deux sols, ce qui est conforme à la propriété connue de l'argile de retenir l'azote ammoniacal. Cependant l'argile, par elle-même, semble plutôt nuisible qu'utile pour la nitrification proprement dite.

PLÂTRE ET ARGILE. — L'addition simultanée de plâtre et d'argile dans des proportions variant de 10 à 40 p. 100 a eu pour résultat de réduire progressivement les pertes d'azote. Cet effet est surtout marqué pour les terres à éléments fins.

D'autre part, dans les expériences de PICHARD, une terre argilo-sableuse plâtrée renfermant 40 p. 100 d'argile et 1 gr. 023 d'azote organique par kilogramme a présenté, après

dix-huit mois, un gain d'azote s'élevant à 0 gr. 293 par kilogramme, ou 28,53 p. 100 de l'azote initial. Or, des recherches de SCHLÖSING, il résulte qu'une terre non calcaire absorbe annuellement à l'hectare 23 kilos d'azote ammoniacal, ce qui constituerait pour la terre en expérience et pendant la période de dix-huit mois, un apport de 0 gr. 018 par kilogramme, ou 1,75 p. 100. La majeure partie de l'azote aurait donc été fixée sous forme d'azote libre et les conditions qui viennent d'être rapportées s'appliquent, par suite, autant à la fixation directe qu'à la transformation ultérieure de l'azote en composés nitrifiques.

LIMITATION DU PHÉNOMÈNE DE FIXATION

La fixation d'azote n'est pas un phénomène illimité. Elle a lieu sur les sols neufs, mais au bout de quelques années, en l'absence de végétation, cette action s'épuise et peut même subir une rétrogradation. BERTHELOT¹ pense que cette particularité tient sans doute à ce que les Microbes fixateurs ont accompli leur cycle vital et épuisé la transformation de la dose limitée de matières organiques et nutritives pour eux que la terre renfermait. L'oxydation de ces matières doit aussi contribuer à diminuer leur action comme l'a montré DEHÉRAIN.

1. BERTHELOT, Sur quelques conditions générales de la fixation de l'azote par la terre végétale, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XIV, 1888, p. 473.

CHAPITRE V

Morphologie et Physiologie des tubercules radicaux des Légumineuses et des organismes qu'ils contiennent.

Bien que les propriétés améliorantes des Légumineuses aient été connues des Romains, les nodosités qui se rencontrent sur les racines de ces plantes sont restées inaperçues jusqu'à la fin du xvi^e siècle où la première mention en est faite, d'une façon encore un peu vague, par DALECHAMP¹. On trouve en effet dans son *Histoire générale des plantes* à l'article : POIS CHICHES, les phrases suivantes :

« Alia duo Ciceris syluestris genera hic ex Dalechâpio proponimus. Primum radicibus longis huc et illuc euagatur, lignosis, multiplicibus, *nodosis*, subrubris », phrases que le traducteur et commentateur Jean des MOULINS, reproduit ainsi² :

« Nous auons icy adiouté deux autres sortes de Ciches sauuages..... dont le premier a les racines longues, esparses çà et là, ligneuses et en grand nombre, *pleines de nœuds*, rougeastres ».

La première description plus complète remonte à Von WULFFEN³, en 1828, chez le Lupin.

1. (J. DALECHAMP), *Historia generalis plantarum*, t. I, lib. III, cap. XLIV, p. 463, Lugdunum, 1587.

2. Id., Trad. J. DES MOULINS, t. I, chap. XLIV, p. 389, Lyon, 1615.

3. Von WULFFEN, Ueber den Anbau der weissen Lupine im nördlichen Deutschland, Magdeburg, 1828.

CARACTÈRES EXTÉRIEURS

Les tubercules radicaux sont des excroissances charnues assez variables d'aspect. Pourtant comme l'a remarqué ERIKSSON¹, leur forme, qui peut différer beaucoup dans des espèces voisines, est assez constante chez les représentants d'une même espèce. Les principaux types ont été décrits par ERIKSSON, par TSCHIRCH² et par KIRCHNER³. Ils sont tantôt simples et sphériques (*Lotus*, *Anthyllis*, *Phaseolus*, *Ornithopus*), tantôt ovoïdes



Fig. 5. -- Nodosités des Légumineuses. — A gauche *Trifolium pratense*; à droite *Cracca minor* (tubercules dichotomes). — Gr. nat. (D'après VUILLEMIN.)

(*Trifolium*, *Hedysarum*), elliptiques (plusieurs *Lathyrus*), irrégulièrement arrondis (*Soja hispida*), coniques (*Caragna*), digités à des degrés divers. ERIKSSON cite plus de trente espèces où la ramification est rare et toujours peu compliquée, tandis qu'ailleurs elle frappe presque tous les tubercules (la plupart des *Vicia*, entre autres *Vicia sativa*, et *Medicago sativa* où les tubercules deviennent coralloïdes).

Ces ramifications sont d'ailleurs assez tardives et TSCHIRCH⁴ paraît admettre que chez le *Vicia sepium*, elles ne naîtraient que par un nouveau cloisonnement du méristème générateur après que le tubercule primitif se serait vidé à la fin d'une première période végétative.

TSCHIRCH⁵ envisage d'ailleurs deux types de tubercules, l'un représenté par le Lupin et l'autre par le *Robinia* et appartenant également à la généralité des Légumineuses. Chez le Lupin, c'est la racine elle-même qui leur donne naissance :

1. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, *Doctor diss. Lund*, 1874; Id., *Bot. Zeit.*, t. XXXII, 1874, p. 382.
2. TSCHIRCH, Beitrag zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. deuts. Bot. Gesell.*, t. V, 1887, p. 58.
3. KIRCHNER, Die Wurzelknöllchen der Sojabohne, *Beitr. z. Biol. der Pflanzen*, Bd. VII, 1895, p. 213.
4. TSCHIRCH, Ueber die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ges. naturw. Freunde zu Berlin*, 1887; *Bot. Centralbl.*, t. XXXI, 1887, p. 224.
5. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Forschr. auf d. Gebiete der Agrikulturphysik*, t. X, 1888, p. 230.

les saillies ressemblent à des épaississements locaux qui s'étendent peu à peu et envahissent tout le corps de la racine. Le second type, notablement différent, consiste en tubercules de forme variable, mais fixés latéralement à la racine.

Une disposition semblable à celle du *Lupin*, mais moins accentuée avait été vue longtemps auparavant chez l'*Arachis hypogea* par POITEAU¹.

CORNU² pensait que les tubercules ne sont jamais recourbés, opinion qui a été contredite plus tard par SCHINDLER³. Il les croyait sessiles et reposant par leur base élargie sur la racine qui leur donne naissance. Nous verrons plus loin qu'il n'en est pas toujours ainsi.

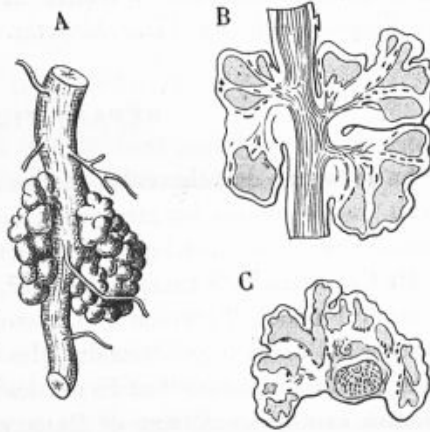


Fig. 6. — Nodosités du *Lupinus mutabilis*. — A, Vue extérieure; B, coupe longitudinale (schéma); C, coupe transversale (schéma). (D'après WOROZINE.)

Enfin VAN TIEGHEM et DOULIOT⁴ ont mentionné une autre forme : les racines sont elles-mêmes dilatées, le siège de l'hypertrophie étant le parenchyme cortical.

COULEUR

La coloration des tubercules est la même que celle des racines. Blanchâtre au début, elle brunit par suite d'une subérisation des couches externes, surtout dans la région occu-

1. POITEAU, Notes sur l'*Arachis hypogea*, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 3^e série, t. XIX, 1853, p. 268.

2. CORNU, Études sur le *Phylloxera vastatrix*, *Mém. Acad. des Sc.*, 2^e s., t. XXVI, 1878, p. 1.

3. SCHINDLER, Zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Papilionaceen, *Bot. Centralbl.*, t. XVIII, 1884, p. 84.

4. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

pant les 2/3 inférieurs des renflements. Le liège subsiste d'ailleurs, sous forme d'une cupule, quelque temps après la destruction des tubercules.

CORNU¹ a remarqué quelques autres colorations : grise, violacée, brunâtre ou verdâtre à la base, rose ou teintée de jaune au sommet. VUILLEMIN² a trouvé des nodosités rouge-brique et d'aspect farineux (*Vicia hirsuta*).

RÉPARTITION

La présence de tubercules sur les racines des Légumineuses avait frappé depuis longtemps certains systématiciens qui les considéraient comme l'un des caractères de la famille.

DE CANDOLLE³, WYDLER⁴, LOHRER⁵, TREVIRANUS⁶, DE VRIES⁷, CORNU, FRANK⁸, TSCHIRCH⁹, ERIKSSON¹⁰, POITEAU¹¹ les signalent ou les nient tour à tour dans les différents genres de Papilionacées. BRUNCHORST¹² et FRANK les retrouvent chez diverses plantes exotiques; CORNU et BRUNCHORST en rencontrent sur les racines d'un grand nombre de Cæsalpiniées et Mimosées, LACHMANN¹³ chez les *Acacia stricta*, *A. hispidissima*, *A. Lo-*

1. CORNU, Études sur le *Phylloxera vastatrix*, Mém. Acad. des Sc. 2^e s., t. XXVI, 1878, p. 1.

2. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, Ann. Sc. agr., 1888, I, p. 121.

3. A. DE CANDOLLE, Prodomus, t. II, 1825, p. 93 et suiv.

4. WYDLER, Beitrag zur Kenntniss heimischer Gewächse. — Flora, t. XLIII, 1860.

5. LOHRER, Beiträge zur anatomischen Systematik, Inaug. Diss., Marburg, 1886.

6. TREVIRANUS, Ueber die Neigung der Halsengewächse zur unterirdischen Knollenbildung, Bot. Zeit., t. XI, 1853, p. 393.

7. DE VRIES, Wachsthumgeschichte des rothen Klee's, Landw. Jahrb., t. VI, 1877, p. 893.

8. FRANK, Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen, Bot. Zeit., t. XXXVII, 1879, p. 377.

9. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, Ber. d. d. Bot. Gesell., t. V, 1887, p. 58.

10. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, Doctordiss., Lund, 1874.

11. POITEAU, Notes sur l'*Arachis hypogea*, Ann. des Sc. nat. Bot., 3^e sér., t. XIX, 1853, p. 268.

12. BRUNCHORST, Ueber die Knöllchen an dem Leguminosen Wurzeln, Ber. d. d. Bot. Gesell., t. III, 1885, p. 241.

13. LACHMANN, Ueber Knollen an den Wurzeln der Leguminosen, Landw. Mittheilungen, Zeitschr. d. landw. Lehranstalt zu Poppelsdorf, Heft 1, 1858, p. 34, 52.

phanta, *A. latifolia*; PRILLIEUX¹ chez l'*Acacia berteriana* et NAUDIN² chez l'*Acacia stenophylla*; etc.

Il semble donc permis à l'heure actuelle de conclure à la répartition générale des nodosités radicales dans tous les groupes de Légumineuses, au moins dans les conditions normales de développement.

SIÈGE DES NODOSITÉS

La plupart des auteurs qui se sont occupés de la question sont d'accord pour considérer les tubercules comme des dépendances constantes des racines.

ERIKSSON et TSCHIRCH affirment qu'il n'en existe pas sur les rhizomes; toutefois LECOMTE³ pense au contraire qu'il peut s'en rencontrer sur ces organes.

TREVIRANUS⁴ a noté que ces nodosités se montrent sur le pivot comme sur les radicelles, même filiformes, et qu'on ne saurait constater en elles de préférence pour l'un ou l'autre de ces sièges.

Leur apparition est irrégulière (ERIKSSON, VUILLEMIN).

On a déjà vu que les tubercules de Lupins sont groupés généralement autour du collet. D'autres végétaux présentent des variations individuelles plus ou moins étendues, liées aux diverses conditions de végétation. C'est ainsi que VUILLEMIN⁵ a trouvé des Trèfles rouges dont le chevelu était chargé de renflements au voisinage de la surface du sol, alors que les autres parties en étaient dépourvues. TSCHIRCH⁶ a fait des obser-

1. PRILLIEUX, Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.

2. NAUDIN, Recherches sur les nodosités ou tubercules des Légumineuses, 1 br. in-12, 1897.

3. LECOMTE, Observations sur le mémoire de VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine... des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 109.

4. TREVRANUS, Ueber die Neigung der Hülsgewächse zu unterirdischer Knollenbildung, *Bot. Zeit.*, t. XI, 1853, p. 393.

5. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 121.

6. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. V, 1887, p. 58.

uations analogues sur les *Phaseolus* et les *Medicago*. NAUDIN¹ a noté des irrégularités assez accentuées chez les *Trifolium*, les *Medicago* et le *Genista candicans*.

NATURE DES NODOSITÉS

Les opinions les plus diverses ont été émises au sujet de la nature des tubercules.

DALECHAMP², puis, plus tard, A. DE CANDOLLE³ et TULASNE⁴ en faisaient de simples excroissances des tissus de la racine.

MALPIGHI⁵ les considérait comme des galles, mais toutefois avec une certaine réserve, car il n'avait jamais réussi à y rencontrer de larves. Cette manière de voir fut d'ailleurs contestée au milieu du siècle dernier par TREVIRANUS.

BOUSSINGAULT⁶, dans ses mémorables expériences sur la végétation a observé leur apparition sur des racines de Haricots, mais leur signification physiologique lui a échappé.

CORNU⁷, ayant remarqué sur les racines de Sainfoin des galles d'anguillules, à côté des tubercules, pensa d'abord que ces derniers avaient une origine parasitaire; il ne tarda pas d'ailleurs à revenir de son erreur et à s'apercevoir que les tubercules sont essentiellement différents des galles à anguillules. Il vit que leur structure ne peut se rapporter ni à celle d'une tige ni à celle d'une racine et il supposa que ce sont des radicules.

BIVONA⁸ en fit des Champignons développés sur les racines et y distingua deux espèces, *Sclerotium lotorum* correspondant

1. NAUDIN, Recherches sur les nodosités ou tubercules des Légumineuses, 1 br. in-12, 1897.

2. DALECHAMP, *Historia generalis plantarum*, t. I, lib. III, cap. XLIV, p. 463, Lugdunum, 1587.

3. A. DE CANDOLLE, *Prodomus*, t. II, p. 93 et suiv., 1825. — Id., *Mémoire sur les Légumineuses*, 1825.

4. TULASNE, *Fungi hypogei*, 1862, p. 169, 198.

5. MALPIGHI, *Anatome plantarum; pars sec.; De Gallis, Opera*, I, 1687.

6. BOUSSINGAULT, La terre végétale considérée dans ses effets sur la végétation, *Agronomie*, t. I, 1858, p. 283.

7. CORNU, Commission du Phylloxera, 17 janvier 1876. — Id., *Etudes sur le Phylloxera vastatrix*, *Mém. Acad. des Sc.*, 2^e s., t. XXVI, 1878, p. 1.

8. BIVONA, *Pugill. plant. rar. Siculæ*, t. IV, p. 26; t. VI, fig. 1, 2.

aux tubercules simples et *S. medicaginum* correspondant aux tubercules ramifiés.

FRIES¹ adopta cette manière de voir, tout en remarquant que ces *Sclerotium* ne sont pas une cause de dommage pour leur hôte.

CLOS² prit, on ne sait pourquoi, les nodosités pour des lenticelles, opinion qui tomba d'elle-même lorsque GASPARRINI³ eut montré la présence d'un appareil vasculaire dans ces organes. Ce dernier auteur croyait que les nodosités étaient des extrémités de racines et il les nommait *tubercules spongiolaires*.

KOLACZEK⁴ en fait aussi des racines spongieuses.

Les observations de GASPARRINI et celles des auteurs qui se sont occupés depuis de la question ne parviennent pas à convaincre CLOS⁵ qui, en 1899, déclare encore que les tuberculoïdes ne peuvent être considérés comme des transformations de radicules.

TREVIRANUS⁶ les prend pour des bourgeons floraux imparfaits à base tubéreuse qui dériveraient des bourgeons aériens par suite d'un arrêt de développement lié au défaut d'air et de lumière. Il accepte les dires de DOODY⁷ qui suppose que l'*Ornithopus perpusillus* peut, dans certains cas, se reproduire grâce à ces tubercules de racines. Cette observation n'a d'ailleurs jamais pu être répétée avec succès par aucun auteur.

LACHMANN⁸ remarque leur analogie anatomique avec les radicules dont ils diffèrent seulement par la présence du tissu parenchymateux central.

1. FRIES, *Systema mycologicum*, t. II, 1822, p. 250.

2. CLOS, Du collet dans les plantes et de la nature de quelques tubercules, *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 3^e sér., t. XIII, 1850, p. 5.

3. GASPARRINI, Osservazioni sulla struttura dei tubercoli spongiolari di alcune piante Leguminose, *Lettere all' Acad. di Napoli*, 1851.

4. KOLACZEK, *Lehrbuch der Botanik*, 1856.

5. CLOS, Les tuberculoïdes des Légumineuses d'après CH. NAUDIN, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XLVI, 1899, p. 396.

6. TREVRANUS, Ueber die Neigung der Halsengewächse zu unterirdischer Knollenbildung, *Bot. Zeit.*, t. XI, 1853, p. 393.

7. DOODY cité par VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 121.

8. LACHMANN, Ueber Knollen an den Wurzeln der Leguminosen, *Landw. Mitth.; Zeitschr. d. landw. Lehranstalt zu Poppelsdorf*, t. I, 1858, p. 34, 52.

DE VRIES¹, TSCHIRCH², VAN TIEGHEM et DOULIOT³ voient dans les tubercules une forme particulière de racines, opinion qui est actuellement admise par la plupart des botanistes.

Quant à la cause productrice de ces excroissances, elle a donné lieu aux plus vives controverses. Nous nous bornerons à citer ici quelques noms seulement parmi les nombreux auteurs qui se sont occupés de cette partie de l'étude des nodosités; il nous sera donné d'y revenir avec détails un peu plus loin.

Remarquons seulement que la plupart des observateurs pensent que la formation de ces organes est sous la dépendance de l'action d'un cryptogame.

C'est ainsi que WORONINE⁴ croit qu'il s'agit d'une Bactérie; PRILLIEUX⁵ et KNY⁶ y voient un Myxomycète; ERIKSSON⁷ un Champignon plus élevé en organisation. LUNDSTRÆM⁸ cherche à établir que ce sont des productions symbiotiques rentrant dans la catégorie de celles qu'il a nommées *phytodomaties* et qui résulteraient de l'adaptation des racines à la présence d'un Champignon parasite pour le plus grand profit de la plante elle-même. Il croit en outre que les tubercules, grâce à l'hérédité, pourraient apparaître spontanément dans certaines espèces.

PRAZMOWSKI⁹ pense que les nodosités sont des productions

1. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

2. TSCHIRCH, Ueber die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ges. naturw. Freunde zu Berlin*, 1887; *Bot. Centralbl.*, t. XXXI, 1887, p. 224.

3. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

4. WORONINE, Ueber die bei den Schwarzerle und der gewöhnlichen Gartenlupine auftretenden Wurzelanschwellungen, *Mém. Acad. imp. St-Petersb.*, t. X, 1866. — Id., Observations sur certaines excroissances que présentent les racines de l'Aune et du Lupin des jardins, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 5^e s., t. VII, 1867, p. 73.

5. PRILLIEUX, Observation à VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine..., *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 108.

6. KNY, Ueber die Wurzelanschwellungen der Leguminosen und ihre Erzeugung durch Einfluss von Parasiten, *Sitzber. des bot. Vereins der Prov. Brandenburg*, 1878.

7. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, *Doctordiss.*, Lund, 1874.

8. LUNDSTRÆM, Ueber Mykodomatien in den Wurzeln der Papilionaceen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXIII, 1888, p. 159.

9. PRAZMOWSKI, Sur les tubercules des racines de Légumineuses, *Congr. des nat. polon.*, 20 juill. 1888; résumé dans *Ann. agr.*, t. XV, 1889, p. 137.

anormales, appartenant à la série des *mycocécidies*, qui ne se développent qu'à la suite d'une infection.

FRANK¹ y voit des formations parasitaires complexes, dans lesquelles se différencierait une portion du plasma de la plante nourricière spécialement adaptée à la capture et à l'introduction de Bactéries mobiles existant dans le sol et qui viennent pulluler dans l'intérieur des cellules du tubercule.

BEYERINCK², ayant réussi des expériences d'infection, considère les petits corpuscules peuplant les nodosités comme de vraies Bactéries et il admet que les renflements radicaux sont des *bactériocécidies*.

Il faudra arriver aux travaux de LAURENT³ et surtout de MAZÉ⁴, pour que la nature des organismes qui nous occupent soit définitivement élucidée.

DÉVELOPPEMENT

Ordre d'apparition. — ERIKSSON et DE VRIES⁵ admettent que la disposition des tubercules n'est liée à aucune loi rhizotaxique et que ces organes naissent tout à fait au hasard, aussi bien en face des cordons vasculaires qu'en face des faisceaux libériens ou de l'espace qui les sépare.

VAN TIEGHEM et DOULIOT⁶ considèrent au contraire que les éléments normalement rhizogènes, c'est-à-dire les cellules du péricycle situées en face des faisceaux ligneux, entrent seuls en jeu.

Cette opinion est acceptée par VUILLEMIN⁷ qui pense que les

1. FRANK, Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. VII, 1889, p. 322.

2. BEYERINCK, Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicicola*, *Bot. Zeit.*, t. XLVIII, 1890, p. 837.

3. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

4. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XI, 1897, p. 44; t. XII, 1898, p. 1 et 128.

5. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

6. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

7. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 121.

tubercules, sans naître d'une façon aussi régulière que les radicules ordinaires, répondent néanmoins par leur situation aux règles rhizotaxiques. Les apparences contraires sont dues à des perturbations analogues à celles qui se présentent dans le cas des racines doubles.

Tissu générateur. — ERIKSSON¹ admettait que, contrairement aux radicules, qui ont leur origine dans le péricycle, la première apparition des tubercules aurait lieu à la suite d'une segmentation active des couches profondes du parenchyme cortical. Plus tard seulement, le péricycle prendrait part à cette division.

PRILLEUX², FRANK³, TSCHIRCH⁴ adoptent cette manière de voir.

DE VRIES⁵ professe une opinion contraire, en ce qui concerne le Trèfle rouge. Il considère les nodosités de cette plante comme procédant du cloisonnement des couches périphériques du cylindre central de la racine mère; mais, au lieu de faire irruption à travers l'écorce, ils restent longtemps recouverts par ce tissu tuméfié.

VAN TIEGHEM et DOULIOT⁶ pensent également que, dans les tubercules, tout ce qui est distinct de la racine génératrice dérive exclusivement du péricycle. L'endoderme, en se cloisonnant, donne une assise digestive, absolument comme il le fait dans la sortie des radicules.

D'après VUILLEMIN, cette manière de voir est parfaitement exacte. Toutefois, il peut arriver que le contenu des assises corticales soit modifié sous l'influence du cryptogame qui les

1. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, *Acta Univ. Lund*, 1874.

2. PRILLEUX, Sur la nature et la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.

3. FRANK, Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen, *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

4. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. V, 1887, p. 58.

5. DE VRIES, Wachsthumgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

6. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

traverse pour arriver au péricycle. On voit même, mais rarement, quelques cloisons apparaître dans l'endoderme et les cellules voisines, en même temps que l'assise rhizogène entre en jeu. Ce cloisonnement irrégulier, dont les anciens observateurs ont exagéré l'importance, n'a d'ailleurs rien de commun avec une production de radicelle qui est, nous l'avons vu, l'acte essentiel de la naissance du tubercule.

STRUCTURE

La structure des tubercules radicaux des Légumineuses a fait l'objet d'une étude très soignée de la part de VUILLEMIN¹.

À l'état jeune, comme l'avait remarqué DE VRIES², ils sont entièrement méristématiques et remplis d'une matière albuminoïde dense. Divers auteurs, principalement CLOS³, BIVONA⁴, FRIES⁵, TULASNE⁶, ont cru qu'ils restaient ainsi toute leur vie à l'état purement cellulaire. Il n'en est rien : à l'état adulte, un tubercule présente toujours deux catégories de cellules nettement distinctes. Les unes occupent la partie centrale; elles sont relativement grandes et semblent remplies d'un contenu dense et fortement granuleux. Autour d'elles, une couche de cellules plus ou moins épaisse constitue une sorte d'écorce dont les éléments sont plus petits et hyalins. Au milieu de celle-ci, on trouve des faisceaux libéro-ligneux en relation avec ceux de la racine. Dans la majorité des cas, ces faisceaux sont disposés en cercle autour de la masse centrale; comme nous le verrons tout à l'heure, ils se détachent du cylindre central de la racine en un tronc ordinairement unique qui se ramifie par la suite.

Lorsque la nodosité est très jeune, elle porte encore des poils absorbants qui disparaissent plus tard. Elle prend alors

1. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 142.

2. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

3. CLOS, Du collet dans les plantes et de la nature de quelques tubercules, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 3^e s., t. XIII, 1850, p. 5.

4. BIVONA, *Pagill. plant. rar. Siculae*, t. IV, p. 26; t. VI, fig. 1 et 2.

5. FRIES, *Systema mycol.*, t. II, 1822, p. 250.

6. TULASNE, *Fungi hypogei*, 1862, p. 169; 198.

une teinte brune et ses cellules externes se subérifient et s'exfolient parfois.

La présence des faisceaux avait été signalée en premier lieu par TREVIRANUS¹ qui avait remarqué leur disposition en un cercle voisin de la périphérie.

WORONINE² en donne une description plus complète chez le *Lupinus mutabilis* et le *L. Cruikshankii* : « Du faisceau vasculaire central de la racine s'échappent, dit-il, d'autres faisceaux vasculaires plus déliés et qui vont se diviser et finalement se perdre dans le tissu parenchymateux des excroissances. La répartition de ces faisceaux entre les cellules du tissu se fait très irrégulièrement et, à leur terminaison, ils ne se composent ordinairement que d'un petit nombre de vaisseaux, parfois d'un seul ».

ERIKSSON³ précise cette description en remarquant la gaine endodermique propre à chaque faisceau et en suivant le trajet des cordons vasculaires qui confluent au point d'insertion en un seul groupe, si le tubercule prend naissance en face d'un faisceau ligneux, ou en deux groupes, s'il s'insère en face d'un faisceau libérien.

VUILLEMIN⁴, en comparant les relations des faisceaux depuis leur insertion jusqu'à leur extrémité, y voit des faisceaux de racines, groupés normalement à la base, mais soumis dans la portion renflée à certaines anomalies. Il remarque, en effet, que ces faisceaux s'isolent les uns des autres par un processus qui rappelle la division dichotomique des racines de Lycopode; ils se bifurquent à mesure que le tubercule grossit et ils se groupent en cercle. Parfois le tubercule comprend plusieurs radicelles congrescentes à faisceaux également dissociés. De cette façon, l'anomalie des Orchidées se combine à celle des Lycopodiacees.

1. TREVIRANUS, Ueber die Neigung der Hülsengewächse zu unterirdischer Knollenbildung, *Bot. Zeit.*, t. XI, 1853, p. 393.

2. WORONINE, Observations sur certaines excroissances que présentent les racines de l'Aune et du Lupin des jardins, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 5^e s., t. VII, 1867, p. 73.

3. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, *Doctordiss.*, Lund, 1874.

4. VUILLEMIN, Les unités morphologiques en botanique, *A. F. A. S.*, t. XV, 1886, p. 526. — ID., Analyse du travail de LUNDSTROEM, Ueber Mykodomatien, *Journal de Bot.*, rev. bibl., t. II, 1888, p. 49.

VAN TIEGHEM et DOULIOT¹ pensent que chacun des cordons vasculaires du tubercule n'est autre chose qu'une sorte de cylindre central binaire de racine. Leur ensemble communiquerait alors à la nodosité une structure polystélisque.

Cette assertion est vivement combattue par VUILLEMIN². Cet auteur publie, en 1888, un mémoire très étendu relatif aux nodosités radicales des Légumineuses. Si certaines particularités concernant les organismes qu'elles contiennent lui ont échappé, l'étude anatomique qu'il en donne mérite d'être citée avec détails.

Structure primaire des faisceaux. — Dans le cas le plus simple (fig. 7), le tissu conducteur d'un tubercule présente vers l'insertion les caractères des racines binaires. Une seule assise péri-cyclique entoure le système libéro-ligneux et se trouve elle-même enveloppée par un endoderme. Cet ensemble unique ne tarde pas à se bifurquer dès qu'il pénètre dans la zone élargie. Les deux cordons vasculaires s'écartent l'un de l'autre, l'un en haut, l'autre en bas; les deux bandes libériennes se divisent et la moitié de chacune d'elles est entraînée par le faisceau ligneux le plus voisin.

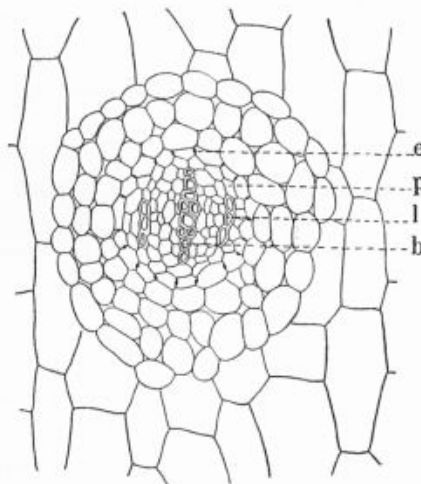


Fig. 7. — Coupe tangentielle d'une radicelle de *Melilotus macrocarpa*, passant par la base d'un tubercule. — e, endoderme; p, péri-cycle; l, liber; b, bois. — G = ? (D'après VUILLEMIN.)

Les deux demi-cordons libériens latéraux correspondant à un même faisceau ligneux se rejettent alors sur la face interne des vaisseaux et fusionnent en un seul amas. Le

¹. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

². VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 149.

péricycle et l'endoderme, entraînés de même par les éléments conducteurs, se referment en arrière et l'on a, au lieu d'un cylindre unique, deux cordons libéro-ligneux qui, considérés isolément, ont l'aspect de faisceaux de tige (fig. 8).

Continuant leur course dans la région renflée, les faisceaux vont encore se dédoubler à plusieurs reprises suivant leur plan de symétrie et s'écarter l'un de l'autre parallèlement au pourtour, de manière à demeurer toujours superficiels (fig. 9).

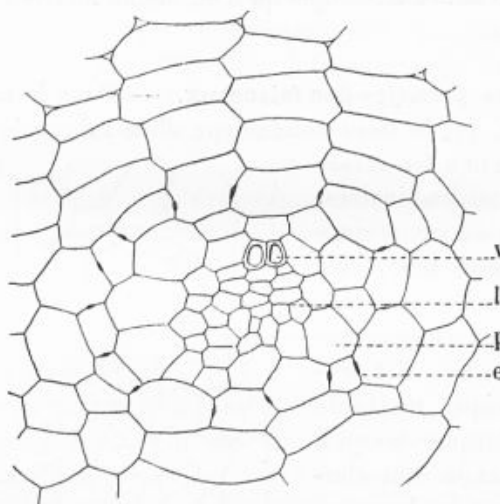


Fig. 8. — Faisceau conducteur isolé; tubercule de *Trigonella hybrida*. — v, vaisseau du bois; l, liber; p, péricycle; e, endoderme. — G = 475. (D'après VUILLEMIN.)

Les nouvelles branches des faisceaux présentent une orientation uniforme et telle que leurs plans de symétrie viennent se couper sur l'axe de l'organe. On est donc, contrairement à l'opinion de VAN TIEGHEM et DOULIOT, « en présence d'une disposition cyclique parfaitement caractérisée, bien qu'astélique » (*loc. cit.*), rappelant assez exactement la structure d'une tige d'*Equisetum limosum*, à ce seul fait près que l'orientation des faisceaux est inverse.

Dans les tubercules formés par la juxtaposition de plusieurs racines, les coupes pratiquées à la base montrent un nombre égal de systèmes conducteurs isolés. Dès qu'ils pénètrent dans la région renflée, tous se dichotomisent à plusieurs reprises

comme dans le premier cas. Mais, les faisceaux issus d'un même cylindre, au lieu de conserver entre eux la disposition cyclique, prennent place successivement dans un cercle plus vaste et unique comprenant tous les cordons conducteurs étalés à une égale distance de la périphérie ; dans la région moyenne, ils constituent ainsi un ensemble homologue de celui des tubercules formés d'une seule radicelle.

Dans les tubercules ramifiés-digités, les faisceaux se partagent entre les branches, soit en y passant directement, soit

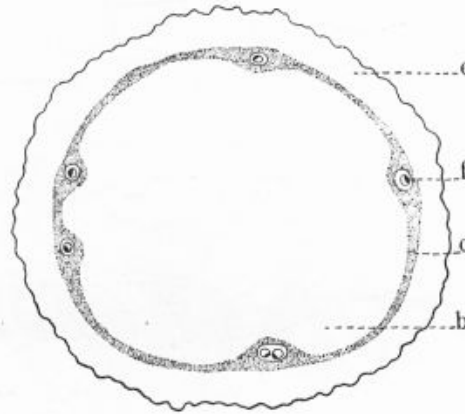


Fig. 9. — Schéma d'une coupe transversale d'un tubercule de *Trigonella hybrida*, dans la région moyenne. — e, zone corticale ; c, gaine amylacée ; f, faisceaux ; b, zone médullaire avec cellules spéciales. (D'après VUILLEMIN.)

après s'être dichotomisés et avoir donné un faisceau à chacune des ramifications.

Structure secondaire des faisceaux. — On n'avait pas décrit avant VUILLEMIN de formations secondaires dans les faisceaux des nodosités. Dans les faisceaux jeunes (fig. 10), on rencontre fréquemment une couche génératrice de 2-3 assises de cellules entre les vaisseaux et le liber. Tantôt son fonctionnement est presque nul ; d'autres fois, la production du liber secondaire s'accroît et devient même prédominante vers les bords du cambium. Puis, le péricycle situé en dehors des plus vieilles trachées se segmente à son tour ; ses assises internes donnent naissance à de petits îlots de tubes criblés et les fais-

ceaux deviennent ainsi concentriques. Il peut même arriver que le péricycle se cloisonne seul, sans que l'assise génératrice ait fonctionné : les faisceaux prennent alors une apparence en quelque sorte bicollatérale.

Le liber d'un faisceau âgé présente souvent des amas de fibres isolées ou groupées en îlots au voisinage du péricycle.

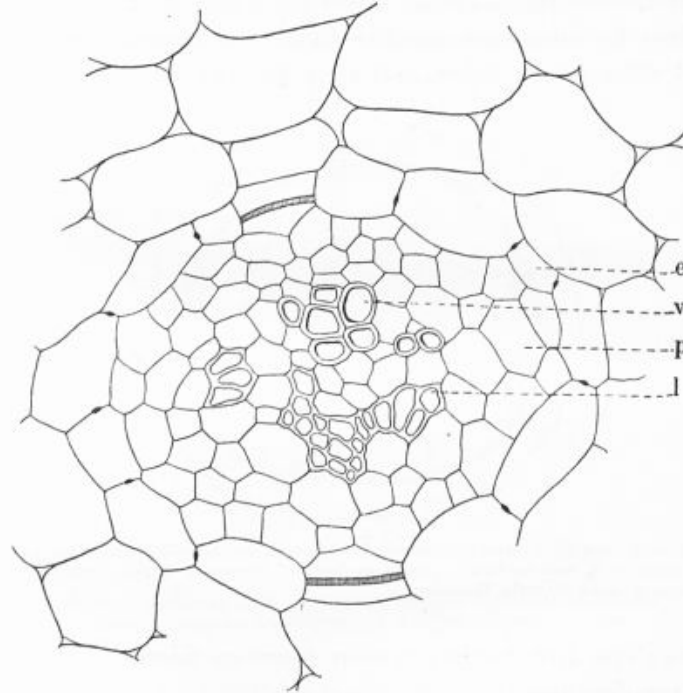


Fig. 10. — Faisceau de nodosité en voie de division. — Cloisonnement du péricycle. — G = 475.
(D'après VUILLEMIN.)

Celui-ci reste toujours parenchymateux. L'endoderme possède ses plissements subérifiés caractéristiques.

Structure du parenchyme. — Le parenchyme constitue, au début, la majeure partie du tubercule. Sa prédominance persiste lorsque les cordons libéro-ligneux s'y sont organisés.

DE VRIES¹, l'un des premiers, avait montré que ce tissu,

1. DE VRIES, Wachstums-geschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

homogène lorsqu'il est jeune, se différencie plus tard en deux couches, une corticale et une médullaire à grands éléments, PRILLIEUX¹ nomme *zone amylière* la couche corticale et *cellules spéciales* les éléments de la masse centrale.

CORNU² pense, au contraire, que la couche corticale ne contient pas d'amidon. Peut-être prenait-il pour cette couche la poche provenant du cloisonnement de l'endoderme de la racine mère.

LECOMTE³, ayant remarqué des tubercules sur certains rhi-

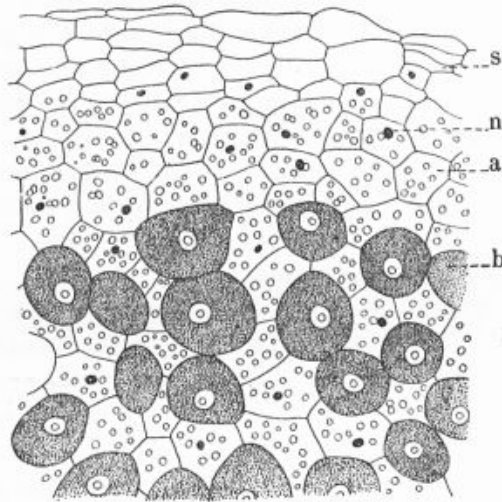


Fig. 11. — Fragment de tubercule de *Doryenium herbaceum*. — s, liège; n, tissu cortical; p, noyau; b, cellule à Bactéroïdes. — G = 224. (D'après VUILLEMIN.)

zomes admet que, dans ce cas, l'amidon se trouve uniquement dans la tige souterraine mère au détriment absolu de la nodosité.

VUILLEMIN⁴ a repris l'étude de cette question. Il constate

1. PRILLIEUX, Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.

2. CORNU, Études sur le *Phylloxera vastatrix*, *Mém. Acad. Sc.*, 2^e s. t. XXVI, 1878, p. 1.

3. LECOMTE, Observation à VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine..., *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 109.

4. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 162.

qu'une coupe axiale d'un tubercule naissant sur une racine de *Melilotus officinalis*, le montre constitué par une masse de cellules issues de cloisonnements répétés du péricycle de la racine mère. Ce tissu diffère cependant beaucoup des méristèmes ordinaires; il est en effet caractérisé par l'extrême densité de son cytoplasma et par la grande taille des noyaux. Ces cellules, que VUILLEMIN appelle avec PRILLIEUX *cellules spéciales*, rappellent ainsi d'une façon saisissante les cellules jeunes de l'albumen des graines ou mieux encore les cellules mères des grains de pollen. Elles forment d'abord une masse compacte entourée de cellules ordinaires dont la proportion varie suivant les plantes et qui n'en sont pas séparées par une ligne de démarcation parfaitement tranchée. Le tissu central est parfois bourré d'amidon.

Quand le tubercule vieillit et que les cordons conducteurs s'y organisent, il y a lieu de remarquer que les cellules spéciales ne s'étendent pas au delà du cercle de faisceaux.

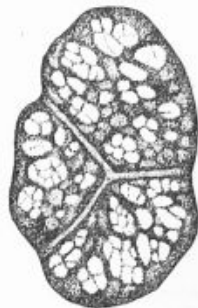


Fig. 12. — Membrane d'une cellule spéciale de *Dorycnium herbaceum*, traitée par le chloroiodure de zinc. — G = 475. (D'après VUILLEMIN.)

Les cellules ordinaires du parenchyme, ainsi que l'ont montré DE VRIES¹, FRANK² et VUILLEMIN, ont leurs parois minces, leur cytoplasma creusé de vacuoles, leur noyau assez volumineux (6 à 9 μ). SCHINDLER³ y a rencontré de l'oxalate de chaux cristallisé chez le *Phaseolus vulgaris* et l'*Anthyllis Vulneraria*; TSCHIRCH⁴ a observé cette même substance sous forme de bâtonnets enveloppés d'un revêtement cellulosique adhérent à la membrane chez les *Robinia*.

Les cellules spéciales ont une membrane cellulosique assez épaisse et fenêtrée d'espaces minces (fig. 12), non colorables par le chloroiodure de zinc et traversés en tous

1. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

2. FRANK, Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen, *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

3. SCHINDLER, Zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Papilionaceen, *Bot. Centralbl.*, t. XVIII, 1884, p. 84.

4. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. V, 1887, p. 58.

sens par des travées moins fortement développées que le fond même. Le noyau est très volumineux (18 à 25 μ). Sa structure est celle des noyaux typiques avec bâtonnets chromatiques et nucléole très gros (4 à 5 μ), renfermant parfois un nucléolule.

DES BACTÉROIDES

Fixons maintenant notre attention sur le cytoplasma des cellules spéciales. Une coupe intéressant cette région, placée dans l'eau, laisse échapper d'innombrables corpuscules bactériiformes, doués de mouvements très vifs qu'on a pris longtemps pour des mouvements browniens.

LACHMANN¹ a, le premier, signalé ces corpuscules; il remarqua leur coloration en brun par l'iode et les compara aux Vibrions.

WORONINE² les rapproche également des Bactéries et croit qu'ils se reproduisent par scissiparité et par bourgeonnement.

ERIKSSON³ remarque que ces éléments sont souvent ramifiés en dichotomie et pourvus d'une membrane cellulosique propre.

SORAUER⁴ et DE VRIES⁵ y voient des organismes étrangers introduits tardivement dans les tubercules.

Un examen plus approfondi montre à PRILLIEUX⁶ et à FRANK⁷ que les cellules les plus jeunes du parenchyme spécial renferment des filaments protoplasmiques non cloisonnés, assez irréguliers, qui traversent les membranes cellulaires et se renflent çà et là en masses ovoïdes ou sphériques, sessiles ou pédicellées, isolées ou réunies par 2-3 sur le même support.

1. LACHMANN, Ueber Knollen an den Wurzeln der Leguminosen, *Landw. Mitth.; Zeitschr. d. landw. Lehranstalt zu Poppelsdorf*, Heft I, 1858, p. 34-52.

2. WORONINE, Ueber die bei der Schwarzerle und der gewöhnlichen Gartenlupine auftretenden Wurzelschwellungen, *Mém. Acad. imp. Sc. St-Petersb.*, t. X, 1866.

3. ERIKSSON, Studier öfver Leguminosernas rotknölar, *Acta Univ. Lund*, 1874.

4. SORAUER, Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 2^e éd., t. I, 1886, p. 743.

5. DE VRIES, Wachstumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

6. PRILLIEUX, Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.

7. FRANK, Ueber die Parasiten in den Wurzelschwellungen der Papilionaceen, *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

Pour KNY¹ et PRILLIEUX, ces filaments sont des parasites de même nature que certains plasmodes de Myxomycètes. Quant aux corpuscules bactéroïdes, ce seraient des productions de ces prétendus plasmodes.

FRANK pense aussi à la nature autonome des bâtonnets dichotomes. Il en fait des filaments mycéliens qui, par bourgeonnement, donneraient les corpuscules qui les accompagnent dans les cellules. Il remarque une sorte de relation inverse entre le développement de ces derniers et celui des filaments. Il leur nie tout mouvement propre et donne au Champignon le nom de *Schinzia leguminosarum*. Plus tard², il refusera le caractère d'organismes aux Bactéroïdes et les considérera comme de simples corps albuminoïdes formés par le protoplasma cellulaire.

La première opinion de FRANK est admise par SCHINDLER³, TSCHIRCH⁴, BENECKE⁵, MATTIROLO⁶, MATTIROLO et BUSCALIONI⁷, VAN TIEGHEM et DOULIOT⁸, LECOMTE⁹, PIROTTA¹⁰, etc.

De son côté, HELLRIEGEL¹¹ reprend l'idée que les Bactéroïdes sont réellement des Bactéries, mais il se fonde seulement sur leurs apparences. Cependant, à la suite des observations du chimiste allemand, beaucoup d'auteurs adoptent sa manière de voir.

1. KNY, Zu dem Aufsatze des Herrn Prof. B. FRANK : Ueber die Parasiten..., *Bot. Zeit.*, 1879, p. 537.

2. FRANK, Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. VII, 1889, p. 322. — Id., *Landw. Jahrb.*, t. XIX, 1890, p. 523.

3. SCHINDLER, Ueber die Bedeutung der sog. Wurzelknöllchen bei den Papilionaceen, *Journal f. Landw.*, t. XXXIII, 1885, p. 325.

4. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. V, 1887, p. 58.

5. BENECKE, Ueber die Knöllchen an den Leguminosen Wurzeln, *Bot. Centralbl.*, t. XXIX, 1887, p. 53.

6. MATTIROLO, I tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 420.

7. MATTIROLO et BUSCALIONI, Si contengono batteri nei tubercoli delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 464. — Id., Ancora sui batteroidi delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 536.

8. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

9. LECOMTE, Observation à VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine..., *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 109.

10. PIROTTA, Alcune osservazioni nei tubercoli radicali delle Leguminose, *Atti della Soc. Toscana di Sc. nat.*, t. VI, 1888, p. 45.

11. HELLRIEGEL, Beziehungen der Bacterien zu der Stickstoffernährung der Leguminosen, *Forschr. Agrikulturphysik*, t. X, 1887, p. 63, 66.

LUNDSTRÖM¹ tout en admettant avec FRANK que les Bactéroïdes sont de nature fongique et vivent en association symbiotique avec les racines, pense que ces organismes jouent dans les cellules un rôle destructeur de l'amidon. Il figure les gros filaments intracellulaires bien connus depuis la description d'ERIKSSON, sans se prononcer sur leur véritable nature.

MARSHALL WARD² étudie à son tour les filaments qu'il croit de nature mycélienne; il les voit pénétrer dans les poils radicaux de la Fève et, de là, dans le parenchyme cortical des racines. Arrivées à destination, ces hyphes bourgeonneraient à la manière des cellules de Levure en développant d'innombrables germes d'une petitesse extrême et semblables à des Bactéries, tandis que le protoplasma des cellules de la racine prendrait les caractères d'un plasmode par suite d'un afflux de matériaux de réserve. MARSHALL WARD pense en outre que, lors de la mort des tubercules, les éléments fongiques se répandent dans le sol et vont infecter d'autres racines.

PRAZMOWSKI³ voit dans les filaments intracellulaires des productions protoplasmiques appartenant au microbe des Légumineuses et dans lesquelles les Bactéries spécifiques cocciformes se multiplieraient avant de donner naissance aux Bactéroïdes qui en dériveraient par voie endogène. Les cordons protoplasmiques seraient donc des sortes de zooglées.

POUR BEYERINCK⁴, les Bactéroïdes sont des corpuscules albuminoïdes de forme définie, provenant de la transformation d'une Bactérie que la Légumineuse capture et cultive dans ses tissus pour en faire des réserves d'albumine.

PICHI⁵ ne précise pas les rapports des corpuscules et des filaments. En maintenant des Bactéroïdes en culture cellulaire

1. LUNDSTRÖM, Ueber Mykodomatien in den Wurzeln der Papilionaceen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXIII, 1888, p. 159.

2. MARSHALL WARD, On the tubercular swellings on the roots of *Vicia Faba*, *Phil. Trans.*, t. CLXXVIII, 1887, p. 539.

3. PRAZMOWSKI, Die Wurzelknöllchen der Erbse, *Landw. Versuchsst.*, t. XXXVII, 1890, p. 161. — ID., *Bot. Centralbl.*, t. XXXVI, 1888, p. 215, 248, 280.

4. BEYERINCK, Die Bakterien der Papilionaceen Knöllchen, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1888, p. 758.

5. PICHI, Alcune osservazioni sui tubercoli radicali delle Leguminose, *Atti della Soc. toscana di Sc. nat.*, t. VI, 1888, p. 45.

en présence d'une solution concentrée de saccharose, il voit apparaître dans leur intérieur des masses arrondies et réfringentes qu'il prend pour des spores. Il admet enfin autour des filaments la présence d'une membrane de cellulose qui pourrait être décelée en les traitant par l'iode et l'acide sulfurique, résultat auquel VUILLEMIN¹ arrivait en même temps en traitant des préparations par l'eau de Javelle puis par le chloroiodure de zinc.

Confirmée par KOCH² en 1890, cette observation était en contradiction avec les théories des observateurs qui voyaient dans les filaments des plasmodes de Myxomycètes ou de simples réserves albuminoïdes.

VUILLEMIN³ essaie de cultiver le Champignon en maintenant les tubercules en chambre humide. Il voit leur contenu se diviser en masses arrondies qu'il prend pour des sporanges, bien qu'il n'ait pu y rencontrer de spores capables de germer, mais seulement des organismes mobiles dont il fait des zoospores. Il en conclut que le Champignon considéré appartient aux Chytridinées et, en particulier, au genre *Cladochytrium*; il propose de le nommer *C. tuberculorum*.

LAURENT⁴ étudie d'une manière plus complète les organismes des nodosités, non seulement par l'examen direct, mais encore en isolant le Microbe et en le cultivant en milieux artificiels. Bien qu'il n'apprécie pas à sa juste valeur la nature des filaments muqueux intracellulaires, son travail contient un grand nombre de faits intéressants qui méritent d'être rapportés.

Si l'on écrase des fragments de tubercules sur une lame porte-objet, on remarque, à l'examen microscopique, de petits corps bactériiformes d'aspect variable et que LAURENT, à l'exemple de BRUNCHORST, nomme *Bactéroïdes*. Ils ont environ 1 μ de diamètre transversal, mais il y en a de plus gros et de

1. VUILLEMIN, Remarques sur le mémoire de LUNDSTRÖM : Ueber Mykodomatien, *Jnal de Bot.*, t. II, 1888, Rev. bibl., p. 49.

2. KOCH, Zur Kenntniss der Fäden in den Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Bot. Zeit.*, t. XLVIII, 1890, p. 607.

3. VUILLEMIN, Les tubercules radicaux des Légumineuses, *Ann. Sc. agr.*, 1888, I, p. 190.

4. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

plus minces. Les uns rappellent l'apparence de Bacilles, mais avec des contours moins réguliers (Haricot, Cytise, Lupin); d'autres ont une forme en Y ou en T (Pois, Vesce); il y en a même parmi ceux-ci qui sont plus irréguliers et ont des ramifications dichotomiques. Chez le *Soja hispida*, les Bactéroïdes sont un peu différents : ils ont l'aspect de baguettes d'environ $3\ \mu$ de long, souvent arquées et parmi lesquelles la disposition en Y est rare ¹.

La description de ces diverses formes a du reste été donnée

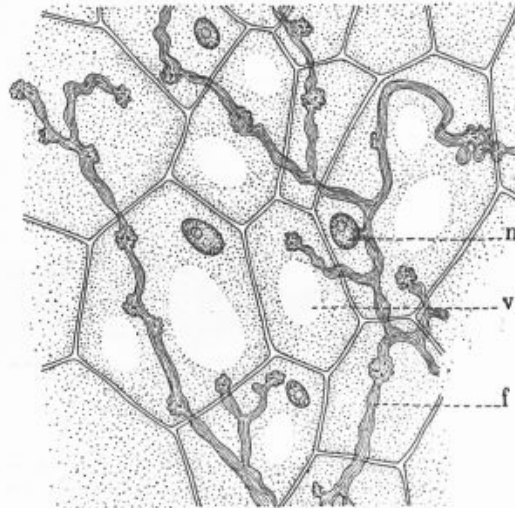


Fig. 13. — Fragment d'un jeune tubercule de Fève cultivée montrant les filaments muqueux *f*. — *n*, noyau; *v*, vacuole. — G = 700. (D'après LAURENT.)

par MORCK ² dans 65 espèces de Légumineuses appartenant aux trois groupes des Papilionacées, Cæsalpiniées et Mimosées.

Les Bactéroïdes se comportent vis-à-vis des réactifs comme les Bactéries : ils sont colorés par les couleurs d'aniline, l'iode, l'hématoxyline, etc.

L'action de l'eau iodée montre la présence d'amidon dans

1. KIRCHNER, Die Wurzelknöllchen der Sojabohne, *Beitr. z. Biol. der Pflanz.*, Bd. VII, 1895, p. 213.

2. MORCK, Ueber die Formen der Bakteroïden bei den einzelnen Species der Leguminosen, *Inaug. Diss.*, Leipzig, 1891.

la plupart des cellules à Bactéroïdes, même lorsqu'elles ne sont pas pourvues encore de ces organismes; cet amidon n'est que transitoire et jouera un rôle important dans la physiologie du tubercule.

Si l'on désire pousser plus loin l'étude des nodosités et des êtres qui les habitent, il importe de renoncer aux moyens employés d'habitude pour les études histologiques. Ainsi l'immersion dans l'alcool donne de mauvais résultats, car les

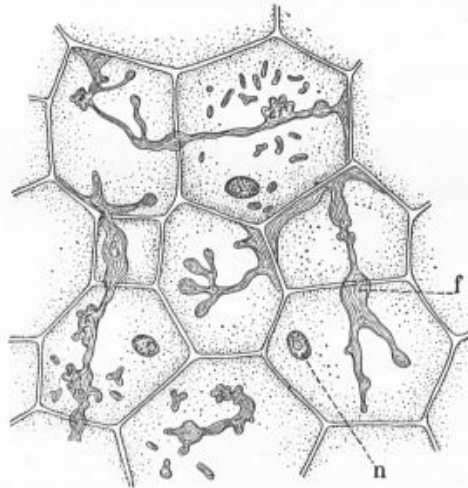


Fig. 14. — Cellules d'un tubercule de Pois avec filaments et Bactéroïdes. — Les filaments sont accolés par places aux parois cellulaires. — f, filaments; n, noyau. — G = 700. (D'après LAURENT.)

filaments deviennent très difficiles à distinguer au milieu du contenu cellulaire coagulé. L'iode suffit pour les rendre apparents en les colorant en jaune, mais le meilleur réactif est le violet dahlia. Il suffit de plonger pendant quelques minutes des coupes minces de nodosités dans cette solution pour mettre en évidence, dans toutes les cellules à Bactéroïdes, l'existence des filaments muqueux traversant les cellules de part en part et présentant souvent des épaississements locaux aux points où ils perforent les cloisons cellulaires. Pour FRANK, cette particularité, de même que la forme amincie et pointue de certains rameaux, s'expliquerait par un étirement des cordons protoplasmiques dû à l'accroissement des cellules en voie de déve-

loppement dans lesquelles ils s'étaient introduits. D'autres fois les filaments s'appliquent le long des parois des cellules et se contentent d'envoyer dans le protoplasma environnant de fins ramuscules que le violet dahlia met parfaitement en évidence (fig. 14).

NATURE DES FILAMENTS MUQUEUX

Essayons de préciser la nature des filaments muqueux. LAURENT¹, ayant remarqué dans certaines préparations des Bactéroïdes typiques adhérents à ces filaments, pense à leur dépendance réciproque. Il admet que les Bactéroïdes se forment par bourgeonnement comme certains articles-Levures qui se montrent sur le mycélium de divers Champignons microscopiques du groupe des Ustilaginées. Se basant en outre sur la formation endogène dans les Bactéroïdes de corpuscules réfringents qu'il prend pour des spores, à l'instar de BEYERINCK², LAURENT rapproche l'organisme des Légumineuses des *Pasteuria* et propose de les réunir dans une même famille, celle des *Pasteuriacées*, comprenant les deux genres *Pasteuria* et *Rhizobium*, ce dernier étant représenté par l'unique espèce *R. leguminosarum*, symbiote des Légumineuses.

MAZÉ³ a montré l'inexactitude de cette interprétation. En effet, dans une préparation de pulpe d'un jeune tubercule à peine visible à l'œil nu, on ne trouve que des Cocco-Bacilles et jamais de filaments mycéliens, parce que la substance qui les constitue diffuse immédiatement dans le suc cellulaire et dans la goutte d'eau que l'on dépose sur la lame de verre. Il est clair que si ces tubes étaient formés par un être vivant, ils résisteraient à ce mode de préparation, comme aussi à tous les autres qui ont pour but de les mettre en évidence dans les

1. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

2. BEYERINCK, Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1888, p. 758.

3. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, p. 1898, p. 1.

coupes de nodosités. Loin de là, leurs seuls réactifs sont ceux que l'on peut appliquer au protoplasma vivant.

D'autre part, si l'on examine des cultures obtenues comme il sera dit plus loin, en présence d'une dose considérable de saccharose, on voit apparaître au fond du vase des tubes

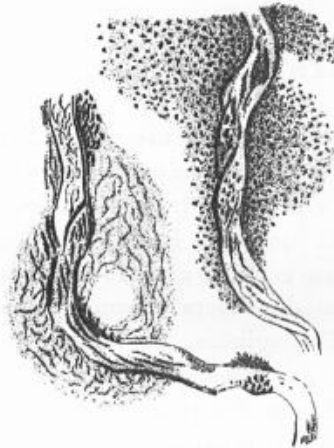


Fig. 15. — Tubes muqueux formés dans un bouillon de Haricots à 6 p. 100 de saccharose. — G = 500. (D'après MAZÉ.)

enchevêtrés, en tout semblables à ceux des nodosités et pourvus comme eux de renflements et d'étranglements. Ces tubes se colorent bien par les colorants protoplasmiques et ils sont remplis de Cocco-Bacilles. On ne peut donc pas voir dans ces filaments un mycélium fongique : ils résultent tout simplement d'une accumulation de mucosités autour des Bactéries ; ils ne constituent pas un organisme vivant et on doit les considérer comme un produit accessoire du développement des Bactéries

et non comme leur élément générateur.

CULTURE DU MICROORGANISME DES NODOSITES

Bien que plusieurs auteurs aient tenté de cultiver le Microbe des nodosités, on peut dire que les seuls essais couronnés de succès sont ceux de BEYERINCK, PRAZNOWSKI, LAURENT et MAZÉ.

BEYERINCK¹ a réussi à cultiver les Bactéroïdes des nodosités en les ensemençant sur une décoction de tiges de Pois ou de Fèves additionnée de 7 p. 100 de gélatine et de 0,25 p. 100 d'asparagine. Il obtint un organisme, polymorphe au début, mais dont les caractères tendaient à s'uniformiser lorsqu'on faisait une série de repiquages successifs sur milieux artifi-

1. BEYERINCK, Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1888, p. 758.

ciels. On peut d'ailleurs remarquer que plus les cultures sont vigoureuses, plus les organismes qu'elles renferment se rapprochent de leur forme normale, tandis que, dans le cas contraire, la forme ramifiée des Bactéroïdes domine. Pour BEYERINCK, la cause de l'inégal développement des colonies est dû à la durée du séjour des organismes qui ont servi de semence dans l'intérieur du protoplasma de la plante nourricière.

Sur milieu gélatiné préparé à l'aide des liquides décrits ci-dessus, on observe des colonies plus ou moins hyalines, de grandeur et de consistance variables et hémisphériques.

PRAZMOWSKI¹ utilise une décoction de feuilles de Pois gélatinée.

LAURENT² opère de la manière suivante : des fragments de racines de Pois cultivés dans les solutions nutritives et pourvus de nodosités ont été stérilisés par immersion de 20 minutes dans du sublimé à 1/1000, puis lavés à trois reprises dans de l'eau distillée stérilisée. Ces fragments ont été ensuite broyés au moyen d'un agitateur flambé et quelques gouttes, prélevées à l'aide d'une pipette, ont été introduites dans les milieux de culture. Ce procédé est préférable à celui qui consiste à piquer les nodosités, car, de cette manière, on contamine souvent la prise d'essai. De plus, le broyage occasionne un mélange intime des Bactéroïdes d'âge différent qui présentent une aptitude très inégale au développement.

Le milieu de culture utilisé par LAURENT était au début celui de BEYERINCK; plus tard il a été modifié par suppression de l'asparagine, cette substance ne s'étant montrée d'aucune utilité.

Sur bouillon de Pois gélatiné, le développement est assez inégal, ce qui tient sans doute à l'état physiologique des Bactéroïdes au moment de l'ensemencement. Les plus petites colonies sont arrondies; les plus grandes ont parfois des contours sinueux et rappellent celles que l'on observe dans certaines cultures du *Cladosporium herbarum*, mais ces dernières

1. PRAZMOWSKI, Die Wurzelknöllchen der Erbse, *Landw. Versuchsst.*, t. XXXVII, 1890, p. 290; *id.*, *Bot. Centralbl.*, t. XLIX, 1891, p. 375.

2. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

formes sont rares. Les colonies les plus vigoureuses présentent une extrême viscosité due à ce que les cellules qui les composent sont pourvues d'une coque glaireuse ne possédant aucune des réactions de la cellulose.

PRILLIEUX¹ a cherché à établir un rapprochement entre cette matière glaireuse et le plasmode qu'il avait décrit auparavant, mais cette opinion ne paraît pas acceptable à LAURENT, car la glaire ne s'observe plus si la culture a lieu en milieu liquide.

Ensemencées en surface, les colonies sont blanchâtres et d'aspect glacé. En piqure, il se forme une trace peu marquée qui diminue avec la profondeur.

Dans les bouillons de Pois non gélatinés, il se produit au fond des matras un dépôt dans lequel on retrouve des microorganismes affectant les formes en Y et en T et même les formes ramifiées des Bactéroïdes pris dans les nodosités. Cependant les dimensions des organismes sont moindres que dans les nodosités et il y a prédominance des formes bacillaires.



Fig. 16. — Aspect d'une culture sur plaque de gélose de la Bactérie des Légumineuses. — Gr. nat. — (D'après Mazé.)

MAZÉ² a utilisé comme milieu de culture un bouillon de graines de Haricots préparé par infusion d'une 1/2 heure à 100°. Il évitait de pousser jusqu'à la cuisson pour que l'amidon des Haricots ne se répandit pas dans le liquide. Ce bouillon qui contenait environ 5/10 000 d'azote, était additionné de 2 p. 100 de saccharose, 1 p. 100 de chlorure de sodium et de traces de bicarbonate de soude. D'autre part, en modifiant diversement ce milieu type, MAZÉ a réussi à provoquer l'apparition de formes physiologiques du Microbe sur lesquelles nous insisterons un peu plus loin.

1. PRILLIEUX, Anciennes observations sur les tubercules des racines des Légumineuses, *C. R.*, t. CXI, 1890, p. 926.

2. MAZÉ, Les Microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XI, 1897, p. 44.

Essais d'acclimatation du Microbe des nodosités à d'autres milieux naturels. — STUTZER, BURRI et MAUL¹ ont essayé d'acclimater les Bactéries des Légumineuses à d'autres milieux. Ils se sont servis d'un extrait préparé avec des germinations de Moutarde, qu'ils ensemençaient avec des Bactéries de Luzerne. Cet essai a été infructueux. Il n'en est plus de même si, au lieu d'opérer en masse, on ajoute peu à peu des doses ménagées d'extrait de Moutarde à du bouillon de Luzerne gélatiné. On arrive ainsi à acclimater le Bacille et à le faire vivre sur du bouillon de Moutarde pur. L'organisme ne perd d'ailleurs pas ses propriétés primitives, puisque, reporté sur gélatine-Luzerne, il y pousse de suite vigoureusement.

CULTURE DU MICROBE DES NODOSITÉS DANS DES SOLUTIONS MINÉRALES AVEC OU SANS AZOTE

Les premières cultures du Microbe en milieu minéral ont été faites par PRAZMOWSKI² qui employait une solution de glucose additionnée de sels minéraux. Peu après, FRANK³, puis BEYERINCK⁴ ont dit avoir réussi de semblables cultures.

LAURENT⁵ a également obtenu le développement du Bacille en milieu minéral. Le liquide qu'il utilisait était constitué par de l'eau distillée parfaitement pure et additionnée de 1 / 1000 de phosphate de potassium et de 0,1 / 1000 de sulfate de magnésium. On peut aussi y ajouter 1 p. 100 d'asparagine, 1 à 10 p. 1000 de peptone, fibrine, caséine ou albumine, mais le développement le plus actif est obtenu en présence du saccharose.

Contrairement à l'opinion de FRANK et OTTO⁶ qui pensaient

1. STUTZER, BURRI et MAUL, Untersuchungen über das Anpassungsvermögen von *Bacillus radiculicola* an einem fremden Nährboden, *Centralbl. f. Bakt.*, t. II, 1896, p. 665.

2. PRAZMOWSKI, Die Wurzelknöllchen der Erbse, *Landw. Versuchsst.*, t. XXXVII, 1890, p. 201.

3. FRANK, Ueber Assimilation von Stickstoff aus der Luft durch *Robinia Pseudacacia*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VIII, 1890, p. 292.

4. BEYERINCK, Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bacillus radiculicola*, *Bot. Zeit.*, t. XLVIII, 1890, p. 838.

5. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

6. FRANK et OTTO, Untersuchungen über Stickstoffassimilation in der Pflanze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VIII, 1890, p. 331.

que le mélange d'asparagine et de saccharose est absolument indispensable, LAURENT admet qu'on peut supprimer totalement l'aliment azoté sans entraver la multiplication de l'organisme. Depuis lors, IMMENDORFF¹ n'a pas obtenu, dans une solution nutritive sans azote, ensemencée avec des Bactéries de Lentilles ou de *Vicia Faba*, un développement complet de la Bactérie ou un enrichissement provenant de l'azote atmosphérique. GONNERMANN² est arrivé à des résultats analogues.

Parmi les sucres, on peut employer une solution à 5-10 p. 100 de saccharose, maltose, lactose, dextrose, mannite ou glycérine. Cependant, le saccharose paraît convenir particulièrement : les Bactéries qui s'en nourrissent sont plus grosses, plus régulières et moins ramifiées que celles qui ont végété sur bouillon de Pois gélatiné.

Il semble que l'action de l'air soit surtout nécessaire dans les solutions nutritives privées d'azote combiné. Ce gaz n'agirait donc pas seulement comme source d'oxygène, mais encore comme source d'azote. Les colonies seraient d'ailleurs capables de se développer pendant quelque temps dans l'azote pur (LAURENT). Nous verrons plus loin que MAZÉ a montré que cette dernière affirmation repose sur une erreur d'observation.

INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BACILLE DES NODOSITÉS EN CULTURE ARTIFICIELLE

Les nitrates et les sels ammoniacaux constituent des aliments pour les Microbes des nodosités, comme l'ont établi FRANK, PRAZMOWSKI et LAURENT. Ce dernier auteur³ admet cependant que l'addition de 1/500 ou de 1/1000 de nitrate de potassium ou de sodium aux bouillons de Pois ou de Lupin les rend presque impropres au développement de ces organismes. Il n'en est

1. IMMENDORFF, Beiträge zur Lösung der Stickstofffrage, *Landw. Jahrb.*, t. XXI, 1892.

2. GONNERMANN, Die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Landw. Jahrb.*, t. XXIII, 1894, p. 649.

3. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

nullement ainsi dans des bouillons minéraux additionnés de sucre ou dans des bouillons de Pois ou de Lupin gélatinés.

A la dose de $1/1000$, les sulfates de zinc, de cuivre, d'alumine, de fer, le chlorure de sodium, l'acide tartrique, le tartrate de potassium et l'urée arrêtent le développement des Bactéries dans une solution minérale avec $1/100$ de saccharose.

Le sulfate d'ammoniaque et la potasse à $1/1000$ ne sont pas nuisibles.

Ce sont les milieux neutres ou légèrement alcalins qui conviennent le mieux pour la culture de l'organisme. Dans les diverses décoctions végétales, qui sont naturellement acides, ainsi que dans l'eau de Levure et dans le liquide de RAULIN, aucune croissance n'a été constatée; mais, lorsque ces milieux ont été gélatinés et neutralisés, ils se prêtent fort bien à cet ensemencement.

Enfin la suppression de n'importe quel élément minéral entrant dans le liquide primitif arrête tout développement.

MARCHAL¹, de son côté, a voulu voir à quelle concentration minima s'exerçait l'action nocive des nitrates et s'assurer de la spécificité de cette action. Il a opéré, non plus sur des cultures artificielles du Microbe, mais sur des germinations de Pois qu'il plaçait dans un liquide nutritif inoculé convenablement choisi et auquel il ajoutait des proportions déterminées des sels à étudier. Il a ainsi constaté que la formation des nodosités, chez le Pois, est empêchée, en solution aqueuse, par les nitrates alcalins à la dose de $1/10\,000$, par les sels ammoniacaux à $1/2000$, par les sels de potassium à $1/200$, par les sels de sodium à $1/300$. En revanche, les sels de calcium et de magnésium favorisent nettement la production des tubercules. L'influence de l'acide phosphorique est variable, suivant la base à laquelle il est combiné, mais, en général, elle est plutôt stimulante.

La propriété que possèdent les nitrates d'empêcher la production des nodosités ne serait, d'après l'auteur, nullement spécifique et s'étendrait à tous les sels nutritifs du sol.

LAURENT a interprété ces faits, en ce qui concerne les

¹ MARCHAL, Influence des sels minéraux sur la production des nodosités chez le Pois, *C. R.*, t. CXXXIII, 1901, p. 1032.



nitrate, en supposant que les Légumineuses renferment un composé capable de se combiner à ces substances et d'empêcher ensuite le développement du Microbe des nodosités. Nous verrons plus loin que MAZÉ envisage d'une tout autre façon cette action contraire. Nous nous bornerons ici à résumer quelques-unes des observations de cet auteur qui complètent les données un peu succinctes qui viennent d'être rapportées.

Influence de l'azote minéral. — Comme il a été dit plus haut, le développement du Microbe des nodosités est assez médiocre dans les solutions purement minérales additionnées de 1/1000 de sulfate d'ammoniaque, même placées en couches minces dans des ballons plats; les Bactéries se déposent en cercle dans les parties déclives et forment une légère couche pulvérulente facile à mettre en suspension. Jamais le liquide ne devient visqueux et le saccharose se retrouve presque intact au bout de quinze jours.

Si l'on remplace l'azote ammoniacal par de l'azotate de sodium, il apparaît au bout de quinze jours une membrane au fond du vase et le liquide prend une légère viscosité.

Il en est de même dans une décoction de terre additionnée de 3 p. 100 de saccharose et de 1/1000 de sulfate d'ammoniaque ou de nitrate de sodium. Dans ce dernier milieu, le développement de l'organisme est régulier; il se forme une membrane épaisse, le liquide devient visqueux, le saccharose est consommé et les cultures accusent au bout de trente jours un léger gain d'azote. Le bouillon ammoniacal, même en présence de quelques traces d'azote organique, continue à se montrer un aliment très médiocre.

On peut donc en conclure que le Microbe des Légumineuses est susceptible de vivre dans le sol et particulièrement dans les terres riches en matières organiques, puisque les nitrates, loin de paralyser son développement peuvent au besoin lui servir d'aliment.

Influence des acides. — MAZÉ a étudié l'action des acides sur les Bactéries des nodosités d'une manière plus approfondie que les auteurs précédents. Il a constaté que ces orga-

nismes ne se cultivent pas dans un bouillon de Haricots additionné de 1/1000 d'acide tartrique et que leur mort survient après un contact de deux à trois semaines avec ce milieu.

Sur gélose additionnée de 1/1000 d'acides tartrique ou oxalique, et en ensemençant abondamment, on obtient une culture dans laquelle les Bacilles prennent une apparence piriforme, avec contenu vacuolaire et diamètre de 2 à 3 μ (fig. 17, A). Il convient d'ailleurs de remarquer que, dans ce cas, l'acidité n'atteint pas 1/1000, par suite de la présence dans la gélose de sels terreux qui neutralisent une partie de l'acide.

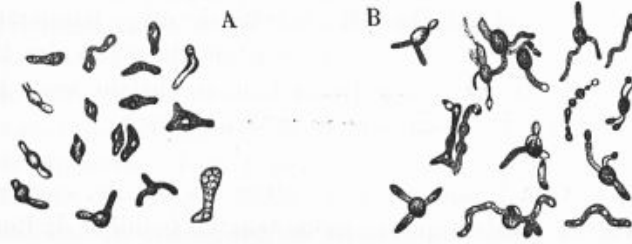


Fig. 17. — A, formes en poire du Microbe des nodosités sur gélose-peptone. — (Les portions incolores représentent les vacuoles; B, Formes ramifiées et renflées obtenues à 35° sur gélose acide et ressemblant aux formes dissociées des filaments âgés d'*Oospora*. — G = 1 200. (D'après MAZÉ.)

Si l'on combine l'action de l'acide et d'une température de 35°, les Bacilles s'allongent, se renflent en chapelet et se ramifient, en affectant l'aspect d'un mycélium d'*Oospora* (fig. 17, B).

Ces formes n'ont d'ailleurs aucune fixité.

Influence de la chaleur. — Sur bouillons de Pois ou de Lupin simples ou gélatinés, l'optimum de développement de la race du Microbe cultivée par LAURENT se trouve entre 22 et 26°; une température de 30° arrête toute végétation.

MAZÉ est cependant arrivé à acclimater le Microbe à une température de 35° avec apparition de nombreux filaments rameux.

A 10° la croissance des colonies est encore assez vigoureuse.

Cependant, en pleine terre, les Pois et les Fèves ne donnent plus guère de nodosités; il en est de même en serre. Pour

LAURENT, la cause de cet arrêt doit être cherchée dans une diminution de la fonction assimilatrice des plantes vis-à-vis du carbone et, par suite, dans une pénurie des aliments hydrocarbonés que le Bacille emprunte à la plante support.

HELLRIEGEL, BEYERINCK et PRAZMOWSKI ont indiqué les températures de 60°, 70°, 75° comme fatales au microorganisme des nodosités. En chauffant les nodosités à 90° ou 95°, LAURENT a constaté qu'elles pouvaient supporter cette température pendant cinq minutes sans que le Microbe soit tué, mais il n'en est plus de même si l'on opère sur des cultures artificielles pour lesquelles ce maximum s'abaisse à 55°. Par contre, les nodosités qui ont été chauffées à cette dernière température déterminent chez le Pois une production de tubercules bien plus active, comme si l'application de la chaleur avait provoqué une certaine excitation de cette propriété.

Influence du temps. — Une culture du Bacille, conservée par LAURENT pendant quinze mois dans du bouillon de Poule, avait perdu tout pouvoir germinatif.

Plus tard, NOBBE¹ a remarqué que la durée de conservation des cultures sur gélatine peut être de deux ou trois mois, si l'on a soin de les tenir à l'abri de la lumière. Les cultures de sept mois ont perdu toute vitalité.

AUTRES FORMES PHYSIOLOGIQUES OBTENUES EN CULTURES ARTIFICIELLES

Outre les formes spéciales obtenues par culture du Microbe des nodosités sur bouillons acides avec ou sans le concours de la chaleur, il est possible d'amener cet organisme à affecter d'autres apparences.

MAZÉ² a remarqué que les cultures anciennes sont le siège de modifications intéressantes. Si l'on prend une semblable

1. NOBBE, Ueber einige neuere Beobachtungen, betreffend die Bodenimpfung mit reincultivirten Knöllchenbakterien für die Leguminosencultur, *Chem. Zeit.*, t. XX, 1896, p. 785.

2. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 130.

culture et qu'on la maintienne pendant quinze jours à trois semaines dans une atmosphère d'azote pur, puis qu'on la réensemence dans les conditions normales, on observe la production d'organismes arrondis, de très petit diamètre, souvent réunis par deux ou disposés en chaînettes. Cette forme ronde, après plusieurs passages successifs sur gélose, reprend son aspect primitif, mais elle n'est plus capable de sécréter de mucosité. Au contraire, les cultures récentes, après un séjour dans l'azote, conservent leurs propriétés caractéristiques.

Bien plus, si l'on prend des cultures anciennes et qu'on les enseme sur plaques, on observe, au bout de deux ou trois jours, l'apparition d'une série de colonies blanches nacrées, étalées sur le milieu et de 3-4 millimètres de diamètre. Un à deux jours après, une autre série de colonies se développe; elles sont plus proéminentes, légèrement jaunâtres et d'un plus faible diamètre. Toutes deux renferment des Bactéries en apparence identiques, mais qu'un examen minutieux permet néanmoins de distinguer, le Microbe des colonies jaunâtres contenant de petites vacuoles.

Ensemencés séparément, ces deux Bacilles ne fabriquent pas de mucosité, mais il n'en est plus de même si on les associe, ou si deux de leurs colonies viennent à confluer : la matière visqueuse se forme au point de contact et envahit rapidement la culture.

L'emploi de pommes de terre permet de pousser la transformation encore plus loin, en se servant bien entendu de cultures anciennes. De bacillaire au début, la forme du Microbe devient progressivement ronde et, en opérant avec les précautions convenables, on arrive à séparer un organisme bacillaire et un autre rond. Il en est de même si l'on opère à l'aide des microorganismes provenant des nodosités. En tout cas, ensemencées séparément, ces deux formes ne donnent pas de mucosité, alors qu'elles en produisent si on les associe.

BIOLOGIE DES DEUX FORMES PRÉCÉDENTES

- Les propriétés biologiques des Microbes des nodosités ne sont pas plus stables que leurs caractères morphologiques. Le

Bacille, au moment où on l'isole des tubercules, ne liquéfie pas la gélatine; les formes rondes qui en dérivent la liquéfient très rapidement, les formes bacillaires très lentement; les Microbes ne troublent pas la gélatine peptonisée; ils se réunissent au fond des tubes et forment un dépôt floconneux.

Leur action sur l'azote libre ou combiné n'est pas moins intéressante. Isolées, les deux formes se conduisent comme des ferments de la matière azotée et ce caractère est d'autant plus accentué que l'on se rapproche de la forme ronde. Il se dégage de l'azote gazeux; on note une consommation de saccharose à peu près inversement proportionnelle à la perte d'azote; enfin il n'apparaît aucune mucosité dans le bouillon.

Lorsque les deux formes microbiennes sont associées, les résultats sont bien différents: il se produit un gain d'azote et la matière visqueuse est sécrétée en abondance.

Dans certaines expériences de Mazé, on a pu noter au cours de la multiplication du Microbe cocciforme une évolution qui s'est accompagnée de la production de mucosité à partir du moment où elle s'est manifestée.

Parallèlement, des séries d'inoculations faites sur des pieds de *Vicia narbonensis* ont montré que les racines des plantes inoculées avec les deux formes microbiennes associées portent de très nombreuses nodosités qui contiennent des Bacilles ramifiés et sont entièrement semblables à celles que l'on obtient par inoculation directe. Mais la forme bacillaire, qui se montrait cependant active au point de vue de la fixation de l'azote *in vitro*, reste impuissante à provoquer l'apparition des tubercules.

D'autre part un examen approfondi a montré à MAZÉ que les formes rameuses étaient non des individus isolés, mais des agrégats d'individus et que, malgré leur dissemblance morphologique et biologique, les deux organismes qui viennent d'être étudiés ne sont que des variétés d'une seule et même espèce.

ISOLEMENT A PARTIR DU SOL DU MICROBE DES NODOSITÉS

Toutes les terres ne renferment pas le Microbe des nodosités. De nombreux observateurs ont montré en effet que les

sols qui n'ont jamais porté de Légumineuses ne conviennent pas aux ensemencements destinés à inoculer les racines de ces végétaux.

D'autre part, les expériences faites par LAURENT¹ au jardin botanique de Bruxelles montrent que, dans les sols cultivés, les microorganismes qui nous occupent ne sont pas répartis d'une manière uniforme.

NOBBE et HILTNER² supposent que, dans les cas où le sol n'a pas porté de Légumineuses depuis longtemps, on y rencontre une forme spéciale qu'ils appellent *Bactérie neutre* et qui est capable de s'adapter à la longue à une espèce végétale déterminée et de donner alors la race correspondante.

LAURENT³ ayant observé dans les vieux tubercules des formes kystiques s'est demandé si elles ne constituaient pas un stade susceptible de se conserver longtemps dans le sol privé de Légumineuses, mais il a essayé sans succès de les faire germer.

MAZÉ⁴ s'est enfin proposé d'isoler du sol les Microbes des nodosités. Il a employé dans ce but des délayures de terre qu'il ensemait parallèlement dans des tubes de gélose et dans des solutions nutritives renfermant des germinations de Vesce de Narbonne qui sert ainsi d'indicateur de présence. A la suite d'une série de tâtonnements qu'il serait trop long de rapporter ici, l'auteur a retenu trois organismes qu'il désigne par les lettres *a*, *b*, *c*. Les Microbes *a* et *b* doivent attirer l'attention par la régularité avec laquelle ils se succèdent dans les cultures. Le premier se montre dès le début de l'ensemencement : il envahit tout le tube et sporule, puis le Bacille *b* fait son apparition et, au bout de huit jours, il semble qu'il soit seul : le Microbe *a* et les spores ont disparu. Cela tient à ce

1. LAURENT, Les Microbes du sol, *Bull. Acad. roy. Belg.*, 3^e s., t. II, 1886, p. 128.

2. NOBBE et HILTNER, Ein aus der ungleichen Wirkungskraft der Knöllchenbakterien sich ergebende praktische Schlussfolgerung, *Magdeb. Zeit.*, 1894, p. 68. — Id., Wodurch werden die Knöllchen besitzenden Leguminosen befähigt, der freien atmosphärischen Stickstoff für sich zu verwerthen, *Landw. Versuchszt.*, t. XLIV, 1893, p. 459.

3. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

4. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 128.

que le Bacille *b* n'est qu'un stade dissocié et mobile de la Bactérie *a* qui a pris naissance à la suite d'une segmentation de formes courtes émanées d'une première sporulation de cet organisme *a*.

Restent donc les deux Bacilles *b* et *c*. En étudiant leurs réactions biologiques, notamment en présence des acides à la température de 35°, ainsi que leur pouvoir fixateur d'azote, la production de mucosités et les résultats de l'inoculation à la Vesce, et en les comparant aux réactions du Bacille authentique, Mazé arrive à cette conclusion que *b* et *c* appartiennent à une espèce unique qui est identique au Microbe des Légumineuses et que ces deux formes sont de l'ordre des formes physiologiques étudiées dans un chapitre précédent.

Chose remarquable, de même que dans les expériences effectuées avec les formes microbiennes obtenues artificiellement, l'association des deux Microbes *b* et *c* est nécessaire pour que l'inoculation aux racines donne des résultats positifs.

Quant à la Bactérie *a*, MAZÉ la considère comme une forme de résistance immobile, incapable d'obéir aux actions chimiotaxiques exercées par les racines des Légumineuses et ne pouvant s'implanter sur ces organes, alors que les Bacilles libres et mobiles possèdent ces propriétés.

FORME « OOSPORA » OBTENUE AVEC LE MICROBE EXTRAIT DU SOL

On a vu que, dans les nodosités, le Microbe des Légumineuses affecte une forme ramifiée. Or MAZÉ¹, dans une culture artificielle de son Bacille *c*, maintenue à la température ordinaire et parvenue à son quinzième repiquage, a remarqué, au bout de deux mois, que la surface de la mucosité portait de petits amas d'une poussière gris cendré qui, examinée au microscope, s'est montrée sous forme de filaments, portant des spores en chapelet, analogues aux filaments sporifères des *Oospora*. Des formes ramifiées identiques ont été obtenues

1. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 145.

ensuite en 24 heures sur bouillons acides, mais, pour fixer ces formes *Oospora*, il convient d'épuiser les générations successives qui prennent naissance par une série de réensemencements répétés un très grand nombre de fois dans un temps très court et dans les conditions les plus défavorables pour le stade à transformer.

La forme obtenue par Mazé pousse bien sur bouillon de Haricots neutre ou alcalin, additionné de 3 p. 100 de sucre et gélosé. Elle pousse sans sporuler sur gélose-peptone et très

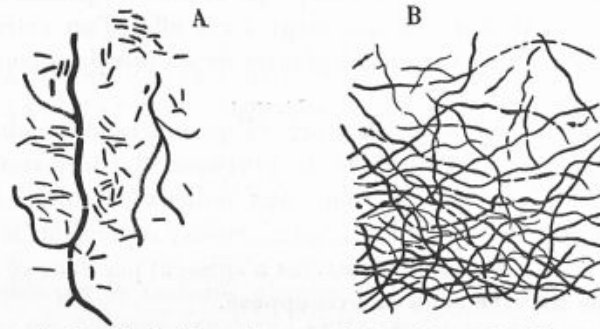


Fig. 18. — A, culture du Bacille *c* évoluant vers la forme *Oospora*. Les filaments n'ont pas encore donné de conidies. — B, fragments de colonie jeune de forme *Oospora*. G = 1 000. (D'après Mazé.)

vigoureusement sur pomme de terre glycinée; dans ce dernier cas, la pomme de terre verdit, puis brunit.

Il a été possible enfin, en faisant d'après le procédé de Roux, METCHNIKOFF et SALIMBENI, des cultures en sacs introduites dans le péritoine de Lapins ou de Cobayes, d'obtenir en partant : 1° du Bacille *a* ou de sa forme dérivée *b*, 2° de la forme *Oospora* dérivée de *c*, une forme microbienne commune, ronde et d'une petitesse extrême (0,45 à 0,47 μ de diamètre). De plus, placées dans les mêmes conditions dans des bouillons peptonés, lactosés ou sucrés, les diverses formes ont produit les mêmes acides et à peu près dans les mêmes proportions.

Il en résulte que les formes indépendantes du Microbe des nodosités qui ont été passées en revue précédemment ne représentent qu'un stade dissocié d'un organisme unique possédant en outre deux formes sporogènes : l'une (Bactérie *a* de Mazé)

donne des spores endogènes, l'autre (*Oospora*) produit des conidies. Ces deux derniers stades se montrent de préférence à la surface du sol, la première étant commune en hiver, la seconde plus fréquente à la fin de l'été.

PRODUCTION DES BACTÉROIDES EN CULTURE ARTIFICIELLE

La culture des Bactéries des Légumineuses s'obtient d'ordinaire par l'emploi de bouillons préparés avec les parties vertes des plantes. HILTNER¹ a fait usage à cet effet d'un extrait de racines obtenu en partant de plantes de six semaines poussées dans l'eau.

HILTNER¹ et NEUMANN² ont prouvé qu'un grand nombre de substances sont susceptibles de provoquer la formation de Bactéroïdes lorsqu'on les ajoute aux milieux de cultureensemencés avec le Bacille des Légumineuses; cependant, le dernier auteur trouve que les nitrates n'agissent pas dans ce sens, alors que HILTNER est d'un avis opposé.

STÜTZER³ admet que les acides organiques, parmi lesquels l'acide succinique, l'acide tartrique, l'acide malique et quelques autres peuvent effectuer cette transformation des Bactéries en Bactéroïdes. Plus tard⁴, il emploie comme milieux nutritifs des extraits de semences de diverses Légumineuses additionnés d'hydrates de carbone et de composés azotés. Il donne comme raison de la production des Bactéroïdes l'action sur les Bactéries de diverses substances chimiques, parmi lesquelles les hydrates de carbone et surtout l'inuline joueraient un rôle prépondérant.

Cette manière de voir est repoussée par SÜCHTING⁵, mais le

1. HILTNER, Ueber die Bakteroiden der Leguminosen-Knöllchen und ihre willkürliche Erzeugung ausserhalb der Wirtspflanzen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VI, 1900, p. 273.

2. NEUMANN, Die Bakterien der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. LV, 1901, p. 187.

3. STÜTZER, Bildung von Bakteroiden in künstlichen Nährböden, *Mitth. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau*, Heft III, 1900.

4. STÜTZER, Bildung von Bakteroiden in künstlichen Nährböden, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 897.

5. SÜCHTING, Kritische Studien über die Knöllchenbakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. XI, 1903-1904, p. 377.

travail de cet auteur étant en cours de publication, on ne connaît pas encore les raisons précises sur lesquelles il se fonde.

En tout cas, NEUMANN, STÜTZER et SÜCHTING n'ont jamais observé la production de Bactéroïdes sur milieux solides.

On voit, par ce rapide exposé, que les causes de la formation de Bactéroïdes en cultures artificielles sont encore loin d'être complètement élucidées et que de nouvelles recherches s'imposent à cet égard.

PARTICULARITÉS BIOLOGIQUES PRÉSENTÉES PAR LES BACTÉROIDES EN CULTURE ARTIFICIELLE

HILTNER¹ a observé, dans les milieux riches en carbone, une différenciation du plasma des Bactéroïdes en ce sens qu'il y apparaît une masse protoplasmique condensée et fortement colorable par la fuchsine phéniquée, tandis que le reste du plasma est presque incolore. Cette partie condensée se compose, d'après HILTNER de diverses substances, principalement d'une matière vivante qui se colore en jaune par l'iode, et d'une autre matière inorganisée qui prend avec le même réactif une coloration rouge brun. Cette dernière substance avait été vue précédemment par quelques auteurs, entre autres par FRANK. HILTNER pense qu'elle est constituée par du glycogène. Quant aux condensations protoplasmiques, elles sont tenues par divers observateurs pour des noyaux; d'autres y voient des spores, ou encore des substances de réserve, de sécrétion ou d'excrétion. Quoiqu'on ne soit pas absolument fixé sur leur valeur, la coloration rouge brun par l'iode semble plutôt en faire des produits d'excrétion ou de sécrétion; en tout cas, ce ne sont sûrement pas des spores.

1. HILTNER et STÖRMER, Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger, *Arb. a. d. Biol. Abt. d. Kais. Ges. Amtes*, t. III, 1903, p. 151, 307.

ABSORPTION DIRECTE DE L'AZOTE ATMOSPHERIQUE PAR LE MICROBE DES NODOSITES EN CULTURE ARTIFICIELLE

On a beaucoup discuté sur la nature de la symbiose entre le Microbe et la Légumineuse support. Cela tient à ce que tous les essais en vue de faire absorber directement l'azote atmosphérique à l'organisme isolé des tubercules avaient échoué.

C'est MAZÉ¹ qui a réussi à montrer que le Bacille des Légumineuses est capable d'augmenter l'azote du milieu sur lequel il vit, en fixant *in vitro* l'azote libre. Dans les expériences auxquelles nous faisons allusion, l'atmosphère a fourni les 2/3 environ de l'azote contenu dans le milieu à la fin de l'expérience.

Le principe de ce travail est de fournir aux Bactéries tous les avantages de la symbiose, c'est-à-dire des composés se rapprochant le plus possible de ceux qui leur sont procurés par la Légumineuse. Dans ce but, MAZÉ prépara un bouillon de Haricots contenant environ 5/10 000 d'azote, additionné de 2 p. 100 de saccharose et gélosé de manière à porter au maximum le contact de la culture avec l'air. Quelques jours après l'ensemencement, les colonies formèrent une couche épaisse au-dessus de la gélose. Des dosages comparatifs d'azote furent alors exécutés de manière à établir le bilan de la végétation. Voici les résultats de l'une des expériences :

Azote initial du milieu.....	62 mgr. 1
Azote final.....	102 mgr. 9
Gain.....	40 mgr. 8

Il convient de remarquer que le milieu nutritif employé contenait du saccharose : c'est en effet que les expériences de WINOGRADSKY ont montré que la formation des matières albuminoïdes n'est possible que par la destruction concomitante

1. MAZÉ, La fixation de l'azote par le Bacille des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XI, 1897, p. 44.

de substances carbonées, et c'est précisément pour n'avoir pas appliqué cette condition expérimentale que les essais précédents avaient donné des résultats négatifs.

Il était intéressant, dans les recherches de MAZÉ, de voir ce qu'était devenu le carbone du milieu : si la doctrine de WINOGRADSKY est exacte, puisque la proportion de l'azote a augmenté, celle du saccharose doit avoir diminué. C'est précisément ce que MAZÉ a constaté en se servant non plus de bouillons solidifiés qui se prêtent mal à de semblables dosages, mais de bouillon de Haricots simplement sucré. Au bout de 16 jours, tout le sucre était consommé. Admettant par analogie qu'il en avait été sensiblement de même pour le milieu solidifié, il établit comme valeur approximative du rapport entre le sucre disparu et l'azote gagné le nombre 0,013.

L'importance de cette conclusion n'échappera à personne. Elle conduit à admettre que la Légumineuse fournit aux Microbes qu'elle héberge non seulement l'azote nécessaire aux premières générations, mais surtout les hydrates de carbone qui doivent intervenir dans l'élaboration de la matière organique.

En poursuivant l'étude des conditions de la fixation de l'azote atmosphérique dans les cultures artificielles, MAZÉ a pu constater que la richesse en azote initial ne doit pas tomber au-dessous de 6 milligrammes pour 50 centimètres cubes de bouillon, ce qui fait à peu près $1/10\,000$ de l'azote combiné. Un excès d'azote est plutôt nuisible; les gains sont déjà moins élevés à partir de 1,5 d'azote combiné initial pour 2 500 de solution nutritive. Le saccharose ne peut tomber au-dessous de 2 p. 100 ni monter au-dessus de 5 à 6 p. 100.

Contestés d'abord par GREIG SMITH¹, les principaux résultats obtenus par MAZÉ ont été confirmés depuis par NEUMANN². Cet auteur a cherché si les microorganismes qui se trouvent dans le sol en contact direct avec les nodosités, ou les Bactéries existant sur les organes aériens sont capables à un certain degré d'assimiler l'azote atmosphérique.

1. GREIG SMITH, The nodule organism of Leguminose, *Centralbl. f. Bakt.*, 2^e Abt., t. VI, 1900, p. 371.

2. NEUMANN, Untersuchungen über das Vorkommen von Stickstoffassimilierenden Bakterien im Ackerboden, *Landw. Versuchsst.*, t. LVI, 1902, p. 203.

Il a utilisé comme milieux nutritifs des extraits des diverses parties du *Vicia Faba*, additionnés de sels minéraux : sulfates de magnésie et de fer, chlorure de sodium et phosphate monopotassique. Des extraits semblables furent préparés avec des nodosités de racines et la terre adhérente et, d'autre part, avec de la tourbe en présence d'eau légèrement ammoniacale. Ces liquides furentensemencés : 1° avec une délayure de la terre adhérente aux racines et aux nodosités du *Vicia*, 2° avec le suc de ces racines et nodosités, 3° avec la bouillie des organes aériens délayée dans l'eau. Les cultures étaient traversées par un courant d'air totalement dépourvu d'azote combiné.

Il y eut, dans tous les cas, assimilation d'azote et cette assimilation paraît subir l'influence de la nature des matières organiques mises à la disposition des Bactéries : dans le premier milieu, contenant ces matières sous forme de pentoses, l'assimilation fut très nette (0,047 d'azote assimilé pour 0,063 initial); elle était beaucoup plus faible avec l'extrait de racines et presque nulle avec la tourbe.

Les recherches de NEUMANN montrent ainsi que, tandis que l'on peut remplacer les hexoses ou hexobioses par des pentoses, la substitution d'autres substances carbonées plus complexes nuit à l'intensité de la fonction fixatrice.

NÉCESSITÉ DE L'INTERVENTION DE L'AIR ATMOSPHERIQUE

LAURENT¹, au cours des expériences qui ont été relatées plus haut, a remarqué que la production des nodosités est liée à l'aération du milieu, mais il supposait que cette aération n'avait pour but que d'amener l'azote atmosphérique au contact des Microbes : il a en effet constaté la formation de colonies dans l'azote pur.

MAZÉ² combat cette opinion. Il cultive le Microbe des nodosités dans des fioles à fond plat, closes et renfermant de l'air

1. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

2. MAZE, Les microbes des nodosités des Légumineuses (second mémoire), *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 1.

privé d'azote combiné, sur une couche de quelques millimètres d'un bouillon de Haricots préparé par infusion d'une demi-heure, additionné de 2 p. 100 de saccharose, de 1 p. 100 de chlorure de sodium et de traces de bicarbonate de soude. Ce bouillon, qui renfermait 5/10 000 d'azote, était solidifié par la gélose. A des intervalles déterminés, on faisait des prises d'essai de l'atmosphère de la fiole et on y dosait l'oxygène. On a pu constater ainsi qu'en 24 heures, une culture en pleine activité de 27 décimètres carrés de surface absorbe environ 330 centimètres cubes d'oxygène.

Parallèlement à cette absorption, il se fait un dédoublement plus ou moins avancé du saccharose, mais les produits intermédiaires de ce dédoublement ne sont pas des acides organiques volatils ou fixes, car la réaction du liquide reste alcaline; en tout cas, en s'accumulant, ils entravent peu à peu la multiplication du Microbe. La disparition du sucre est d'ailleurs très rapide.

Au contraire, une culture analogue, placée dans une atmosphère d'azote rigoureusement pur (préparé par l'action du chlorure d'ammonium sur le nitrite de potassium) n'a donné aucune trace de développement, bien que les Bactéries qu'elle renfermait soient restées parfaitement vivantes.

MAZÉ attribue par suite la formation des colonies observée par LAURENT à ce que l'azote dont cet observateur s'était servi contenait encore des traces d'oxygène.

MÉCANISME DE LA FIXATION DE L'AZOTE PAR LE MICROBE DES NODOSITÉS

Un certain nombre de théories ont été émises pour expliquer ce mécanisme.

DE VRIES¹, ayant observé dans les tubercules une accumulation d'albuminoïdes en toute saison, mais plus particulièrement à la fin de la période végétative, pensait qu'il ne s'agissait là que de simples substances de réserve.

¹. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Versuchsst.*, t. VI, 1877, p. 893.

Tschirch¹ voyait dans ces albuminoïdes des caséines végétales dont la proportion subissait des fluctuations suivant les époques de l'année, mais sans jamais devenir nulle, même après la mort du tubercule. Il attribuait à cette particularité un rôle dans l'enrichissement de la terre en nitrates.

Beeson² alla même plus loin. Il admettait que les Bactéries des nodosités du Pois accumulent plus d'azote que n'en exige la plante et qu'elles restituent le surplus au sol sous forme de nitrates.

La richesse des tubercules des Légumineuses en azote avait frappé un certain nombre d'observateurs. Le tableau suivant, dû à Bréal³ en donne une idée assez nette.

Azote p. 100 de la matière sèche :

	Acacia.	Pois.	Lupin.	Haricot.		Lentille.
				avant floraison.	après floraison.	
Tubercules.....	3,25	2,68	3,30	3,80	4,60	7,00
Tiges et feuilles...	»	»	»	2,30	3,10	»
Chevelu des racines.	»	»	2,50	»	»	1,80
Grosses racines....	2,30	2,30	0,80	»	2,90	»

De leur côté, Lawes et Gilbert⁴ étudièrent les nodosités à diverses époques de la végétation : après développement actif, au point d'accumulation considéré comme maximum, à la maturation complète des graines. Ils remarquèrent que, dans les plantes annuelles, alors que la graine est formée et la plante dépérit, l'azote p. 100 de la matière sèche et l'azote des nodosités mêmes diminuent considérablement; par contre, dans les plantes vivaces, les nodosités formées au début venant à s'épuiser, il s'en produit constamment d'autres pour suppléer à leur disparition. Il y aurait donc dès lors une relation intime entre le gain d'azote de la plante et le développement des

1. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. V, 1887, p. 58.

2. BEESON, Nitric nitrogen produced by Pea, *Jnal Amer. Chem. Soc.*, t. XX, 1898, p. 793.

3. BRÉAL, Observations sur les tubercules à bactéries qui se développent sur les racines des Légumineuses, *Ann. agr.*, t. XIV, 1888, p. 481.

4. LAWES et GILBERT, New experiments on the question of the fixation of free nitrogen, *Proceed. Roy. Soc.*, t. XLVII, 1890.

nodosités. Cependant, les auteurs en sont réduits aux conjectures relativement au mécanisme de la fixation.

STOKLASA¹ remarque la diminution de richesse des tubercules en azote pendant la maturation des graines; il constate qu'une grande partie de l'azote des nodosités existe à l'état d'asparagine et d'amides et il pense que l'enrichissement de ces nodosités est lié à l'intégrité de la fonction assimilatrice des feuilles. Ce seraient alors les feuilles qui fourniraient l'azote aux tubercules.

Il faut bien reconnaître que toutes ces théories sont peu satisfaisantes. Au contraire, l'examen des caractères biologiques du Microbe des nodosités en culture artificielle a permis à MAZÉ² de donner une explication bien plus rationnelle du mécanisme de la fixation.

L'étude des conditions extrêmes de végétation des Bactéries des Légumineuses a permis, en effet, un rapprochement intéressant : lorsqu'il ne se produit pas de gain d'azote, le bouillon de culture demeure limpide; les Microbes forment une membrane assez consistante au fond des vases et le liquide surnageant ne possède aucune viscosité. Au contraire, lorsqu'il y a fixation d'azote, le liquide devient de plus en plus visqueux et va même jusqu'à se solidifier presque totalement.

La substance visqueuse qui se produit ainsi est une matière colloïde, diffusible dans l'eau. Elle contient un composé quaternaire qui traverse facilement la membrane d'un dialyseur.

Cette remarque a été le point de départ d'une série d'observations de la part de Mazé qui a établi que l'azote fixé contribue à l'élaboration de cette substance. De plus, dans les milieux dépourvus d'azote combiné, le Bacille des Légumineuses ne se développe pas : le produit dont il fait la synthèse en partant de l'azote atmosphérique est donc impropre à son développement, ce qui est encore prouvé par l'existence d'un minimum dans la proportion d'azote combiné qui doit nécessairement se rencontrer dans le milieu de culture pour assurer la multiplication de l'organisme en présence.

1. STOKLASA, Studien über die Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanzen, *Landw. Jahrb.*, t. XXIV, 1895, p. 827-863.

2. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses (second mémoire), *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 1.

La matière visqueuse ne se rencontre jamais dans les nodosités, si ce n'est tout au début de leur formation, alors que les faisceaux libéro-ligneux n'y sont pas encore apparus. A ce stade, elle constitue des trainées filamenteuses qui sillonnent les cellules parenchymateuses envahies par le Microbe. Celui-ci y reste englobé pendant un certain temps tout en conservant une forme nettement bacillaire. La forme ramifiée apparaît plus tard, après l'organisation du système vasculaire dans les tissus de la nodosité. A partir de ce moment, la matière mucilagineuse est dissoute et entraînée par la sève dans toutes les parties de la plante pour être définitivement assimilée.

LES FEUILLES DES LÉGUMINEUSES JOUENT-ELLES UN RÔLE DANS L'ASSIMILATION DE L'AZOTE GAZEUX?

La question de la fixation de l'azote par les feuilles des Légumineuses, abstraction faite du rôle des nodosités, a donné lieu à de nombreuses controverses. Parmi les auteurs favorables à l'idée d'une fixation directe par ces organes, on peut signaler : SCHULTZ¹, FRANK², A. GAUTIER et DROUIN³. Par contre, KOSSOWITSCH⁴, à la suite d'expériences conduites avec beaucoup de soin dans des vases de forme appropriée, conclut de l'analyse des gaz en présence de la plante, que les Légumineuses n'absorbent l'azote libre que par leurs racines.

Cette question a encore été l'objet de plusieurs publications de NOBBE⁵ et de NOBBE et HILTNER⁶. Ces auteurs ont montré

1. SCHULTZ, Reinerträge auf leichtem Boden, *Landw. Jahrb.*, 1881, p. 771-848.

2. FRANK, La statistique de l'azote en agriculture, *Ann. Sc. agr.*, 1888, II, p. 24.

3. A. GAUTIER et DROUIN, Recherches sur la fixation de l'azote par le sol et les végétaux, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. div.

4. KOSSOWITSCH, Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf? *Bot. Zeit.*, t. L, 1892, p. 697, 713, 729, 745, 771.

5. NOBBE, Ueber einige neuere Beobachtungen, betreffend die Bodenimpfung mit reincultivierten Knöllchenbakterien für die Leguminosencultur, *Chem. Zeit.*, t. XX, 1896, p. 785.

6. NOBBE et HILTNER, Ueber die Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien ungleichen Ursprungs an verschiedene Leguminosengattungen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVII, 1896, p. 377. — Id., Ueber die Wirkung der Leguminosen-Knöllchen in der Wasserkultur, *Landw. Versuchsst.*, t. LII, 1899, p. 455.

d'une façon élégante le rôle négatif des feuilles en disposant des germinations inoculées de *Robinia pseudo-Acacia* dans des solutions nutritives sans azote de telle sorte que certains pieds eussent leurs nodosités noyées, tandis que d'autres les avaient à l'air. On peut ainsi constater que les plantes à nodosités noyées ne tardent pas à accuser l'état de faim d'azote, tandis que les autres se développent normalement. Si on vide alors partiellement le liquide recouvrant les nodosités du premier lot et qu'inversement on noie les nodosités du second, un revirement soudain se produit, montrant que les feuilles ne jouent aucun rôle dans la fixation de l'azote.

INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA PLANTE SUR L'ASSIMILATION DE L'AZOTE GAZEUX

L'assimilation de l'azote atmosphérique par les Légumineuses a été étudiée par LUTOSLAWSKY¹ dans chaque phase du développement de la plante, c'est-à-dire : 1° de la fin de la germination à l'époque précédant la floraison ; 2° au commencement de la floraison ; 3° en pleine floraison ; 4° lors de la chute des fleurs ; 5° à la maturité.

On constate ainsi que, pour les Pois n'ayant pas reçu d'engrais azoté, l'augmentation totale de l'azote dans la terre et dans les plantes a été : dans la première période de 1 p. 100 ; dans la 2^e de 1,65 p. 100 ; dans la 3^e de 3,14 p. 100 ; dans la 4^e de 5,17 p. 100 ; dans la 5^e de 3,40 p. 100. Les chiffres correspondants pour les Pois ayant reçu un engrais azoté ont été respectivement : 0,145 ; 1,89 ; 2,95 ; 2,20 p. 100.

Le pouvoir assimilateur commence donc à se manifester dès la fin de la germination pour les Pois n'ayant reçu aucun engrais azoté et un peu plus tard pour ceux auxquels on en a fourni ; il passe par un maximum au commencement de la maturation des graines pour diminuer à mesure que cette dernière se poursuit.

Il y a là un fait intéressant à retenir pour la pratique des

1. LUTOSLAWSKY, Beitrag zur Lehre von der Stickstoffernährung der Leguminosen. — Ber. d. landw. Inst. Univ. Halle, Heft XIV, 1900, p. 36.

cultures dérobées : il montre qu'il convient d'enfouir ou de récolter les Pois au moment où ils commencent à former leurs graines ; néanmoins, pour une culture faite en arrière-saison, ces plantes sont encore utiles si elles peuvent parvenir à la période de floraison.

DÉVELOPPEMENT DES NODOSITÉS A LA SUITE D'INOCULATIONS

C'est PRILLIEUX¹ qui remarqua le premier que le développement des nodosités peut être provoqué par l'introduction dans le milieu de culture de racines de Légumineuses portant les mêmes organes.

FRANK², puis HELLRIEGEL et WILFARTH³ ont confirmé l'opinion qui se manifestait ainsi de la cause extérieure de la production des tubercules : leurs essais de culture dans du sable stérilisé, avec ou sans addition des germes provenant soit des nodosités, soit d'un sol ayant porté des Légumineuses, ne laissent aucun doute à cet égard.

D'autres tentatives d'ensemencement ont été poursuivies ensuite par MARSHALL WARD⁴, puis par PRAZMOWSKI⁵.

BEYERINCK⁶, qui avait réussi auparavant à isoler des nodosités un organisme qu'il avait nommé *Bacillus radiculicola*, a essayé à son tour d'inoculer des Fèves disposées dans du sable stérilisé et additionné d'engrais minéraux convenables. Les résultats ont été des plus nets : les racines de toutes les plantes qui avaient poussé dans les pots inoculés avec le Bacille por-

1. PRILLIEUX, Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.

2. FRANK, Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen, *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

3. HELLRIEGEL et WILFARTH, Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen, *Beilageheft zu der Zeitschr. des Vereins f. d. Rübenzucker Indust.*, 1888, Trad. dans *Ann. Sc. agr.*, 7^e ann., t. I, 1890, p. 84 et 189.

4. MARSHALL WARD, On the tubercular swellings on the roots of *Vicia Faba*, *Philos. Trans.*, t. CLXXVIII, 1887, p. 539.

5. PRAZMOWSKI, Ueber die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXVI, 1888, p. 252.

6. BEYERINCK, Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bacillus radiculicola*, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1890, p. 838.

taient des nodosités, tandis que les racines des témoins non inoculés en étaient entièrement dépourvues.

BRÉAL¹ a tenté également de propager les Bactéroïdes sur différentes cultures de Légumineuses disposées dans l'eau ou dans du gravier. Toujours il a remarqué l'apparition de tubercules, alors que les cultures témoins sans addition de Bactéroïdes ne portaient aucune nodosité et dépérissaient.

LAURENT², mettant des plantules de Pois provenant de graines stérilisées et germées dans de l'eau distillée stérilisée, dans un milieu convenable dépourvu d'azote, a constaté que les plantes obtenues ne présentaient qu'un gain d'azote insignifiant et qu'elles étaient dépourvues de nodosités. Il s'est en outre assuré, par une longue série d'essais négatifs, que le développement de ces derniers organes n'était pas dû à l'une des Bactéries banales du sol, mais bien à l'organisme spécifique des Légumineuses.

On peut déterminer la formation de nodosités, ainsi que l'a montré BEYERINCK en piquant une radicelle de Pois avec une aiguille plongée au préalable dans un tubercule radical. Les nodosités apparaissent au bout de dix jours environ si les conditions extérieures sont favorables. Lorsqu'on se contente de mélanger la semence au liquide où se fait la culture, et en ayant soin de ne pas blesser les racines, il faut en général de deux à quatre jours de plus. Il faut encore un peu plus de temps si on ensemence avec une délayure de terre, absolument comme si le Microbe du sol s'y trouvait à l'état de repos et avait besoin d'un certain temps d'évolution préalable avant de pénétrer dans les racines.

Il est possible d'inoculer une Légumineuse donnée avec des nodosités provenant d'autres Légumineuses. C'est ainsi que, pour le Pois, les espèces qui, d'après BEYERINCK sont susceptibles de lui communiquer l'aptitude à produire des tubercules sont : le Pois, la Fève, les Gesses, les Acacias, les *Lotus* et certaines espèces de Trèfles. Il existe cependant une spécificité

1. BRÉAL, Observations sur les tubercules à bactéries qui se développent sur les racines des Légumineuses, *Ann. agr.*, t. XIV, 1888, p. 481.

2. LAURENT, Expériences sur la production des nodosités chez le Pois, *Bull. Acad. roy. Belg.*, 3^e s., t. XIX, 1890, p. 764.

réelle des Bactéroïdes, car les Mélilots, les *Medicago*, les Genêts et surtout les Lupins se montrent beaucoup moins favorables à une semblable production. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir sur ce phénomène.

INFLUENCE DE L'AGE DES NODOSITÉS SUR LE SUCCÈS DES INOCULATIONS

BEYERINCK¹ a signalé le premier ce fait intéressant que, pour assurer le succès des inoculations, il convenait de s'adresser à des nodosités provenant de plantes dont la végétation n'est pas trop avancée. Dès que les fleurs commencent à se montrer, la vitalité du Microbe diminue et, par inoculation, il donne une quantité beaucoup moindre de tubercules qui mettent en outre un temps plus long à se développer.

Plus tard, beaucoup d'ensemencements restent stériles; l'organisme trahit une sorte de malaise et les Bactéroïdes ne peuvent plus évoluer qu'après avoir traversé une période de repos dans le sol.

Ces faits ont été vérifiés par LAURENT², mais on ne doit pas en conclure que l'habitat normal des Microbes des nodosités n'est pas la Légumineuse, car il est très facile de les propager successivement pendant un laps de temps très long sur des Pois, par exemple, en ayant soin de ne prendre comme semence que des nodosités très jeunes.

D'autre part MAZÉ³ a montré qu'au terme de l'évolution de la plante, les nodosités ne renferment plus que des Bactéroïdes de formes simples et doués de propriétés nouvelles : contrairement aux Bactéroïdes des nodosités jeunes, ils ne peuvent plus produire de tubercules par inoculation, mais cette propriété se retrouverait par l'association de deux de ces formes différenciées. Cette particularité expliquerait comment les

1. BEYERINCK, Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicicola*, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1890, p. 838.

2. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

3. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 1 et 128.

formes saprophytiques du sol parviennent à se fixer de nouveau sur les Légumineuses.

PÉNÉTRATION DU MICROBE DES NODOSITÉS DANS LES RACINES DES LÉGUMINEUSES

Le Bacille des nodosités, cultivé en goutte suspendue, se montre très mobile et doué de propriétés chimiotaxiques.

L'attraction exercée sur cet organisme par les racines de la plante qui servira de support a lieu dans la région des poils absorbants, ainsi que MAZÉ a pu s'en assurer en introduisant dans des cultures pures de Microbes des racines privées ou non de ces poils.

Cet expérimentateur s'est alors demandé si le phénomène n'était pas dû à l'action d'hydrates de carbone accumulés dans la région pilifère. En faisant végéter des semences de *Vicia narbonensis* sur de l'eau distillée stérilisée et siphonnant le liquide tous les deux ou trois jours pour le remplacer par du frais, il a constaté que les eaux de germination, réunies et évaporées précipitaient la liqueur de FEHLING. Transportant alors l'expérience sur le terrain bactériologique, il a essayé, dans un appareil approprié, l'action chimiotaxique particulière d'un certain nombre d'hydrates de carbone sur le Microbe et il a constaté que l'attraction exercée par ces substances est très vive. Par contre l'eau de germination des mêmes graines manifeste une action répulsive, probablement par suite de sa réaction acide.

Cette attraction curieuse occasionnée par les hydrates de carbone de la région pilifère a conduit MAZÉ à envisager d'une manière toute nouvelle le rôle contraire des nitrates dans l'assimilation de l'azote. Si, d'après lui, la plante trouve dans le sol assez de nitrates pour transformer en substances quaternaires la majeure partie des hydrates de carbone formés par la fonction chlorophyllienne, ces derniers ne s'accumulent plus dans la racine et, par suite, dans les poils qu'en proportions très minimes. Les Microbes du sol ne sont plus attirés et il ne se fera pas de nodosités.

On a vu précédemment que les Microbes affectent au début, dans les nodosités, la forme de Cocco-Bacilles. C'est à cet état qu'ils pénètrent dans les racines et ils y restent tant que les vaisseaux ne se sont pas organisés dans le tubercule. A partir de ce moment la mucosité sécrétée par le Bacille est dissoute et entraînée; par contre l'acidité se manifeste dans le suc cellulaire et, comme conséquence, apparaissent les formes ramifiées.

THÉORIES DE LA VIRULENCE ET DE L'IMMUNITÉ

FRANK¹ a émis cette hypothèse que les rapports des Bactéries et des Légumineuses étaient régis par une propriété comparable à la virulence que l'on remarque chez les Bactéries pathogènes. La pénétration de l'organisme dans les racines serait sous la dépendance d'une virulence plus ou moins élevée.

HILTNER² a eu l'idée d'adapter cette théorie à l'explication des nombreuses observations relatives aux relations des nodosités et des racines. Il formule une proposition ainsi conçue : « Les nodosités actives confèrent à la plante une immunité vis-à-vis des Bactéries de virulence égale ou moindre, lorsqu'elles renferment des Bactéries; seules des Bactéries de virulence plus élevée peuvent encore pénétrer dans les racines. »

HILTNER veut voir également dans le phénomène la coopération directe de la plante. Il cherche à prouver que l'action des Bactéroïdes donne naissance à des substances antagonistes qui se répandent hors de la nodosité productrice dans le corps de la racine et empêchent ainsi toute introduction nouvelle de Bactéries d'égale ou moindre virulence.

On serait ainsi en présence d'un phénomène comparable à celui qui se manifeste lors de l'action des Bactéries pathogènes : la production d'un anticorps.

Inutile d'ajouter que cette théorie ne se suffit pas à elle-

1. FRANK, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 444.

2. HILTNER, Ueber die Ursache welche die Grösse, Zahl, Stellung und Wirkung der Wurzelknöllchen der Leguminosen bedingen, *Arb. a. d. biol. Abt. des k. Ges. Amtes.*, t. I, 1901, heft II.

même et qu'elle aurait grand besoin d'être étayée sur des preuves sérieuses pour être définitivement acceptée.

FORMATION DE RACES CHEZ LE MICROBE DES NODOSITÉS

Non seulement la nature spécifique de la plante produisant les nodosités influe sur le nombre et les dimensions des tubercules, elle exerce encore une action sur la forme des Bactéroïdes. Comme BEYERINCK¹ l'a montré, l'aspect de ces corpuscules diffère sensiblement chez les diverses espèces de Légumineuses; leur grosseur est variable, leur forme simple ou ramifiée. Ces caractères sont assez constants chez une même espèce; les exceptions qui se rencontrent dans la nature s'expliquent si l'on admet qu'après avoir habité une plante déterminée, le microbe s'en ressent dans sa descendance, au moins pendant une génération. En effet, si l'on inocule des Pois avec des nodosités provenant d'autres plantes, et qu'on broie les tubercules obtenus, on remarque, à l'examen microscopique que les Bactéroïdes, quoique développés sur le Pois, offrent avec les Bactéroïdes normaux de ce végétal des différences assez marquées.

LAURENT² croit cependant que ces différences ne sont pas assez tranchées pour qu'on puisse voir dans les diverses formes plus d'un type spécifique. En effet, s'il est vrai que la race propre au Lupin ne parvient que difficilement à s'acclimater sur le Pois, et si elle se distingue encore par la durée éphémère des filaments mycéliens et la prédominance des Bactéroïdes, il n'en est pas moins vrai que, lorsqu'on réussit à l'inoculer au Pois, elle produit des nodosités dans lesquelles abondent des filaments très irréguliers et *plus durables* que ceux des nodosités du Lupin. Peut-être, dans ces conditions, arriverait-on, avec certaines précautions, à l'acclimater sur le Pois et à l'y faire développer d'une façon régulière.

1. BEYERINCK, Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1888, p. 758.

2. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

D'autres exemples militent en faveur de l'opinion admettant l'existence de races microbiennes variables avec les Légumineuses. Nous nous bornerons à citer les observations suivantes :

KIRCHNER¹, ayant constaté dans un jardin botanique le manque complet de nodosités sur les racines de *Soja hispida*, malgré la présence au voisinage de nombreuses Papilionacées qui en étaient pourvues, s'est demandé si cette particularité n'était pas due à l'absence de la variété convenable de Bactéries dans le sol considéré, car la plante, au Japon, porte des nodosités comme les autres Légumineuses. Il fit venir de la terre du Japon, prise dans un sol cultivé en *Soja*, et la déposa en couche mince à la surface de la terre sur de nouvelles cultures qui formèrent en abondance des tubercules, tandis que d'autres plantes témoins, cultivées dans un sol non inoculé, n'en portaient pas.

On peut rapprocher de cette expérience le fait constaté par NAUDIN² l'année suivante, que certaines espèces de Légumineuses, riches en tubercules dans leur pays d'origine, peuvent se développer normalement sans en présenter trace lorsqu'on les ensemeince loin de ce pays (ex. : *Soja hispida*, *Bauhinia purpurea*).

D'autre part, NOBBE et HILTNER³, tout en admettant que les Bactéroïdes des diverses Légumineuses, même des Mimosées, représentent une espèce unique, supposent que la plante-support agit si énergiquement sur l'organisme qu'elle héberge, que les descendants de cet organisme ne possèdent plus ensuite la plénitude de leurs facultés assimilatrices lorsqu'ils vivent en dehors de la même Légumineuse.

Les mêmes auteurs⁴ tentent alors de préciser la possibilité

1. KIRCHNER, Die Wurzelknöllchen der Sojabohne, *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen*, t. VII, 1895, p. 213.

2. NAUDIN, Recherches sur les nodosités ou tubercules des Légumineuses, 1 br. in-12, 1897.

3. NOBBE et HILTNER, Eine aus der ungleichen Wirkungskraft der Knöllchenbakterien sich ergebende praktische Schlussfolgerung, *Magdeburger Zeit.*, 1894, p. 68. — Id., *Biedermann's Centralbl.*, t. XXIII, 1894, p. 684.

4. NOBBE et HILTNER, Ueber die Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien ungleichen Ursprungs an verschiedene Leguminosen Gattungen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVII, 1896, p. 377.

d'une accommodation à diverses Légumineuses de Bactéries provenant d'autres espèces.

L'idée mère de ce travail est de choisir quelques plantes dans chacun des six grands groupes de Légumineuses qui présentent le plus d'intérêt au point de vue agricole et de les cultiver comparativement dans un même sol inoculé avec des cultures pures de Bactéries provenant des racines de ces six groupes de plantes. Chaque espèce est ainsi cultivée dans six pots ensemencés chacun avec des Bactéries de *Phaseolus multiflorus*, de *Pisum sativum*, de *Trifolium pratense*, de *Robinia pseudo-Acacia*, de *Lupinus luteus* et d'*Ornithopus sativus*. Les résultats de ces expériences sont très nets : l'action bienfaisante des Bactéries sur le développement des plantes ne se fait sûrement sentir que si ces dernières ont été inoculées avec les organismes de tubercules appartenant à leur propre espèce. Sauf dans le cas des *Vicia*, on ne saurait substituer à la Bactérie spéciale à la plante considérée une Bactérie provenant d'une autre espèce sans constater une diminution considérable dans l'action de ces microorganismes.

NOBBE et HILTNER¹ ont enfin essayé de déterminer si la dépendance étroite des Légumineuses et des Bactéries propres à chacune d'elles est susceptible de disparaître avec le temps.

Ils ont utilisé pour cela le matériel de leurs premières expériences en enlevant, à la fin de la première année de végétation, seulement les parties aériennes des plantes pour laisser le sol contaminé et, au printemps, ils ont semé dans les pots des graines de *Robinia*, de *Pisum* et de *Trifolium*.

Prenons comme exemple le *Robinia*. On peut se trouver dans l'un des quatre cas suivants :

1. — Le sol contient des Bactéries de *Robinia* :

1. Le *Robinia* se succède à lui-même ;
2. Le *Robinia* succède à une autre Légumineuse ;

1. NOBBE et HILTNER, Ueber die Dauer der Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien an bestimmte Leguminosen Gattungen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLIX, 1898, p. 467 et 481.

II. — Le sol contient des Bactéries étrangères (Pois ou Trèfle) :

3. Le *Robinia* se succède à lui-même ;

4. Le *Robinia* succède à une autre Légumineuse.

Il est évident que la croissance des plantes étudiées a été influencée par des causes autres que les Bactéries du sol, par exemple par les réserves azotées provenant de la culture précédente, mais c'est l'influence des Bactéries qui, dans les essais de NOBBE et HILTNER, s'est surtout montrée dominante.

Pour les trois plantes étudiées, la récolte maxima a été obtenue dans les deux premiers des cas qui viennent d'être exposés, c'est-à-dire quand le *Robinia* a été cultivé dans un sol contenant des Bactéries de *Robinia*.

Il faut en conclure que les organismes restés dans le sol ont conservé leurs propriétés d'une année à l'autre et qu'elles continuent à vivre sur la même Légumineuse.

Les récoltes obtenues confirment encore un fait observé souvent dans la pratique : c'est quand le *Robinia* se succède à lui-même qu'il donne le plus faible rendement, comme si le sol se fatiguait de porter la même plante, alors cependant qu'il est loin d'être épuisé.

Enfin un point très important est mis en évidence par ces recherches. Les Bactéries du *Robinia* ont développé leurs nodosités sur les racines des deux autres espèces, mais les colonies ainsi fixées se sont montrées incapables d'aider à la croissance de leurs hôtes et, malgré leur présence, les Légumineuses n'ont donné que de faibles récoltes. Il semble donc que les Bactéries établies dans les nodosités soient de valeurs différentes, les unes étant actives et les autres inactives. Cette différence d'activité serait liée, d'après NOBBE et HILTNER, à une dissemblance physique entre les deux formes, les Bactéries inactives se présentant sous l'apparence de groupes complexes, impossibles à diviser et noyés dans une masse gélatineuse.

MAZÉ¹ a précisé certaines conditions essentielles de ce

1. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XIII, 1899, p. 145.

phénomène en recourant à des cultures artificielles. Ces cultures établissent entre les Bactéries de provenances diverses la même ligne de démarcation que l'épreuve d'inoculation directe. Les microbes des Lupins, du Genêt et de l'Ajone donnent des cultures très pauvres sur bouillons de Haricots; par contre, les nodosités des plantes calcicoles y donnent des colonies très prospères. On constate en outre que les premiers microbes, conformément à ce qu'on était en droit d'attendre de leur origine, s'accommodent parfaitement des milieux acides, tandis que l'adaptation des seconds nécessite une série de transitions très ménagées.

Si donc les conditions d'origine identique entraînent une certaine parenté physiologique, on doit obtenir des nodosités sur les racines de Lupins par l'inoculation des Bactéries de l'Ajone ou des Genêts. C'est précisément ce que MAZÉ a constaté, et ce phénomène s'explique si l'on admet une adaptation des Bactéries non plus à une plante déterminée, mais à un sol possédant une réaction donnée.

C'est ainsi que MAZÉ est arrivé à démontrer l'existence de deux groupes de Bactéries, suivant la réaction du sol. En habituant peu à peu un Microbe isolé d'une plante calcicole à vivre dans des milieux de plus en plus acides, et en l'inoculant ensuite à des racines de Lupin, il a pu faire apparaître des nodosités. Il est probable que l'expérience inverse aurait aussi bien réussi.

Les races de Bactéroïdes ne dépendent donc pas tant de la plante-support que de la nature du sol et si la spécificité semble se rapporter à la plante, cela tient à ce que celle-ci obéit à des lois physiologiques identiques et que son développement est subordonné à la réalisation des mêmes conditions.

Cette tendance à ne voir dans les deux groupes de Bactéries des Légumineuses autre chose que des races a été récemment discutée par HILTNER¹. Cet auteur fait remarquer que les divers expérimentateurs qui l'ont précédé et lui-même sont allés trop loin dans la voie de la généralisation des résultats.

1. HILTNER, Ueber die Bakteroiden der Leguminosenknöllchen und ihre willkürliche Erzeugung ausserhalb der Wirtspflanzen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VI, 1900, p. 273.

Il pense avoir des raisons suffisantes pour considérer les deux groupes de Bactéries comme constituant deux espèces distinctes d'un même genre. A la première appartiennent les Bactéries des *Lupinus*, *Ornithopus* et *Soja* qu'il désigne sous le nom de *Rhizobium Beyerinckii*; à l'autre, ceux des *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, *Phaseolus*, *Medicago*, *Anthyllis*, *Onobrychis* et *Robinia* qu'il nomme *Rhizobium radicum*.

Comme preuves de cette manière de voir, HILTNER mentionne l'apparence bacillaire des Bactéries du premier groupe, différente de la forme ramifiée de celles du second, ainsi que la propriété des Bactéries de ce dernier groupe de se développer sur gélatine, tandis que celles du Lupin n'y croissent que misérablement.

Ces raisons semblent insuffisantes à SCHULZE¹. Nous ne pouvons d'ailleurs que partager son avis : il faudrait des expériences précises d'inoculations comparatives pour décider de la valeur de l'hypothèse de HILTNER.

SPÉCIFICITÉ DU MICROBE DES LÉGUMINEUSES

Quelques essais incomplets ont été faits par SCHNEIDER² en vue de provoquer l'apparition de nodosités sur des racines de plantes autres que les Légumineuses. Il emploie pour cela non la méthode d'inoculation directe, mais une méthode détournée.

Il essaie d'abord de cultiver le Microbe, en ensemençant avec un fragment de tubercule de *Melilotus alba* des macérations : 1° de racines et nodosités de cette plante, 2° de sommités feuillées, additionnées de peptone, de pancréatine et de chlorure de sodium, neutralisées et gélifiées. Un autre essai est fait de même avec des Haricots. Par une série de repiquages successifs, SCHNEIDER est arrivé à faire pousser les Bactéries sur du bouillon de Maïs pur préparé de la même manière. Il a alors versé ce bouillon ensemençant sur des pots renfermant de jeunes plants de Maïs et d'Avoine ayant germé

1. SCHULZE, Seradella und Kalk, *Centralbl. f. Bakt.*, 2. Abt., t. X, 1903, p. 665.

2. SCHNEIDER, Essais d'inoculation des Bactéries des Légumineuses aux Graminées, *Illinois Station Bull.*, 1894, p. 301.

dans une serre. Au bout d'un mois de végétation, les racines ne portaient pas de nodosités. Cependant, un certain nombre de pieds de Maïs avaient leurs racines envahies par le micro-organisme, tandis que rien de semblable ne se constatait sur l'Avoine. Bien que peu précise, cette expérience de SCHNEIDER semble donc assez concluante en faveur de la spécificité du Bacille à l'égard des Légumineuses.

PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DU MICROBE DES NODOSITÉS

Les diverses formes microbiennes obtenues par MAZÉ, inoculées à des Lapins, se sont montrées pathogènes. La mort de l'animal survient au bout d'un temps variant de dix jours à trois semaines. A l'autopsie, on observe un exsudat péritonéal assez abondant dans lequel se retrouve le Microbe, principalement sous forme arrondie et d'un diamètre très réduit, manifestant une tendance à s'associer en chaînettes.

QUE DEVIENNENT LES NODOSITÉS?

Les Bactéroïdes formés dans les nodosités n'ont d'ordinaire qu'une durée assez courte. BRUNCHORST¹ et TSCHIRCH² avaient déjà signalé leur rapide disparition et s'étaient fondés dessus pour en faire des réserves albuminoïdes.

Si l'on examine des tubercules parvenus à un âge avancé, on assiste à leur épuisement graduel par le retrait de la sève. Après la disparition des liquides nourriciers, l'acidité cesse également son action; les Microbes font retour à la forme simple et, comme ils ne reçoivent plus d'aliments hydrocarbonés par l'intermédiaire de la plante, ils changent de fonction et deviennent ferments des matières azotées : au lieu de fixer l'azote, ils le consomment. Ils sont alors capables de vivre

1. BRUNCHORST, Ueber die Knöllchen an den Leguminosen Wurzeln, *Ber. d. Bot. Ges.*, t. XIII, 1895, p. 241.

2. TSCHIRCH, Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. Bot. Ges.*, t. V, 1887, p. 58.

dans la terre et d'y prendre soit l'état saprophytique, soit l'état kystique.

Les tubercules arrivés ainsi au terme de leur existence se séparent d'ailleurs de la racine mère par la production de 2-3 assises de liège, ainsi que l'a montré LACHMANN¹. Après la disparition des Bactéroïdes, beaucoup de nodosités présentent une cavité centrale; le plus souvent, elles sont la proie des Bactéries banales du sol et pourrissent.

La durée des tubercules est d'environ un an (LACHMANN) et ceci explique ce fait, souvent constaté dans la pratique, que, sur des pieds âgés de Trèfle ou de Luzerne, par exemple, on ne rencontre plus de nodosités.

1. LACHMANN, Ueber Knollen an den Wurzeln der Leguminosen, *Landw. Mittheil., Zeitschr. d. landw. Lehranstalt zu Poppelsdorf*, Heft I, 1858, p. 34, 58.

CHAPITRE VI

Premières applications à la grande culture des travaux relatifs aux Bactéries des Légumineuses. — Inoculation des sols.

Lorsque HELLRIEGEL et BERTHELOT eurent montré la nécessité de la symbiose des Bactéries et des Légumineuses pour la fixation de l'azote par l'intermédiaire de ces dernières plantes, divers agronomes songèrent à utiliser cette donnée dans la grande culture. La première application est due à SALFELD¹, qui s'est proposé de transformer en cultures des tourbières situées sur la rive gauche de l'Ems. L'azote du sol y était si peu soluble qu'après chaulage, le Seigle, l'Avoine et les Pommes de terre n'ont fourni une récolte convenable qu'après addition de 45 kilos d'azote à l'hectare, d'engrais potassiques et d'acide phosphorique associés. Le champ fut divisé en trois parcelles qui ont reçu par are 40 kilos de l'une des trois terres suivantes : 1° argile glauconieuse renfermant 3,73 p. 100 de potasse; 2° terre forte provenant d'un champ propre à la culture des Fèverolles; 3° terre argileuse provenant d'anciennes digues et renfermant p. 100 de matière sèche : azote 0,21, potasse 0,80, chaux 1,70, magnésie 1,31, acide phosphorique 1,54, sable et argile 80,50. On a ajouté par hectare à ces parcelles 4 000 kilos de chaux vive, 160 kilos d'acide phosphorique des scories et 180 kilos de potasse sous forme

1. SALFELD, Ueber die Verwertung der HELLRIEGEL'schen Versuche mit Leguminosen in landwirtschaftlichen Betrieb, *Biedermann's Centralbl.*, t. XVIII, 1889, p. 239.

de kaïnite, puis on y a semé des Légumineuses. Les récoltes ont été remarquables dans les parcelles 2 et 3, mais surtout dans cette dernière où l'on a trouvé un excédent de récolte de 208 p. 100 sur les graines et de 84,9 p. 100 sur la paille. Au contraire, la parcelle 1, aussi argileuse que les autres, est restée sans effet, ce qui montre qu'on ne peut attribuer l'excédent aux qualités physiques de la terre, mais qu'il est dû vraisemblablement à l'apport par la terre arable des microorganismes nécessaires aux Légumineuses.

Une autre expérience du même auteur¹ a consisté à semer des Lupins dans un sol préparé au milieu d'une lande inculte entourée de bruyères et loin de toute culture. Ce sol a reçu comme engrais de la kaïnite et des scories de déphosphoration et il a été divisé en deux lots dont l'un a été inoculé par addition de terre de Lupins et l'autre n'a rien reçu. Les récoltes obtenues montrent combien l'inoculation a été avantageuse :

Terre non inoculée.....	43 kilos à l'are.
Terre inoculée.....	214 —

A Jönköping, en Suède, VON FEILITZEN² obtient des résultats analogues à ceux de SALFELD. Dans des expériences sur les Pois, les parcelles inoculées donnèrent des récoltes dépassant de 105 p. 100 pour les graines et de 23 p. 100 pour les tiges celles obtenues sur les parcelles non inoculées. SCHMITTER³ observe de même de grands avantages dans l'inoculation des jachères par la terre de Lupins, et VERSTAPPEN⁴ propose cette pratique pour la restauration économique des sols épuisés des pinèdes.

Devant ces résultats satisfaisants, SALFELD⁵ précise de la

1. SALFELD, Düngungsversuche in der Provinz Hannover, *Biedermann's Centralbl.*, t. XVIII, 1889, p. 514.

2. VON FEILITZEN, cité par MILLER, *Jnal Roy. Agric. Soc. England*, 1896, p. 236.

3. SCHMITTER, Die Impfung der Lehmbodens zu Lupinen mit bakterienreicher Erde, *Inaug. Diss.* Heidelberg, 1894. — Id., *Bot. Centralbl.*, t. LVII, 1894, p. 25.

4. VERSTAPPEN, La sidération par les Lupins et la restauration économique du sol épuisé des pinèdes, *Congr. int. Agric. Bruxelles*, 1894, Résumé dans *Ann. agr.*, 2^e s., t. II, 1894-1895, p. 349.

5. SALFELD, Règles à observer dans l'emploi des terres d'inoculation, *Deutsche landw. Presse*, 1897.

manière suivante les règles à suivre dans l'emploi des terres d'inoculation :

Pour chaque variété de Légumineuse, on aura soin d'emprunter la terre d'inoculation à un sol sur lequel la même Légumineuse s'est développée convenablement au préalable et sur lequel on n'aura cultivé ensuite aucune autre espèce.

Comme les tubercules renfermant les Bactéries se trouvent dans la couche arable à une profondeur de 2 à 8 centimètres, on fera le prélèvement à cette profondeur; on réduira la terre en poudre et on la mélangera soigneusement. L'épandage doit être fait le plus tôt possible; dans le cas contraire, on conservera la terre en tas en la préservant du froid par un revêtement de plaques de gazon. Il est très important que les Bactéries soient bien réparties dans le sol; c'est pourquoi on devra faire suivre l'inoculation d'un hersage ou d'un labourage superficiel destiné à les introduire à la profondeur de 2 à 8 centimètres.

Si le sol a reçu de la kaïnite peu de temps auparavant, il convient d'enterrer préalablement cet engrais par un hersage.

Enfin, quand la terre d'inoculation ne doit pas être transportée au loin, il ne faut pas craindre d'en employer une grande proportion, au moins 5 000 kilos à l'hectare, ainsi qu'il résulte des essais de FRUWIRTH¹.

Quant au fait de savoir pendant combien de temps peut se faire sentir l'action favorable d'une inoculation du sol, il semble que, théoriquement, une seule de ces inoculations doive suffire. Cette hypothèse est combattue par FRUWIRTH² qui admet que l'effet d'une inoculation peut se faire sentir au maximum pendant trois ans, WILFARTH³ pense, au contraire, que, dans le cas où les Légumineuses se succèdent sans interruption sur le sol, cet effet est acquis une fois pour toutes et les Bactéries radicales se développent de plus en plus; mais,

1. FRUWIRTH, Neue Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, 1892, p. 18 et 127.

2. FRUWIRTH, Dreijährige Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, t. XIX, 1893, p. 6.

3. WILFARTH, Die neueren Versuche mit Stickstoffsammelnden Pflanzen und deren Verwertung für den landwirtschaftlichen Betrieb, *Biedermann's Centralbl.*, t. XXII, 1893, p. 181.

si l'on supprime la culture des Légumineuses, il est possible que l'abandon devienne funeste aux Bactéries.

SALFELD admet également qu'une inoculation n'est plus nécessaire dès qu'une Légumineuse a été cultivée avec succès sur un sol et que, depuis lors, on ne lui a substitué aucune autre plante de la même famille.

INFLUENCE DE LA NATURE DES SOLS ET DE L'ADDITION DE CERTAINES SUBSTANCES MINÉRALES SUR LE SUCCÈS DES INOCULATIONS

Tandis que la nature de l'espèce n'a pas ou a peu d'action sur la présence ou l'absence de nodosités, les conditions culturales agissent avec une intensité variable. Cette influence du terrain a été mise en évidence pour la première fois par SCHULTZ¹ qui remarque que la Serradelle porte ou non des tubercules suivant la nature du terrain où on la cultive.

I. Influence des nitrates. — DE VRIES², SCHINDLER³ et VINES⁴ ont remarqué que, dans les sols riches, les plantes se conduisent comme si elles sentaient l'inutilité de leur association avec le Microbe des nodosités et ne développaient que peu de tubercules. La même observation avait été faite précédemment en milieu liquide par RAUTENBERG et KUHN⁵.

Cette manière de voir est confirmée par LAURENT⁶ qui, cultivant des Pois dans une terre franche fertile, additionnée de doses exagérées d'engrais azotés, constate que les racines ne portent que peu de nodosités dispersées le long des ramifi-

1. SCHULTZ, Opinion verbale rapportée par SCHINDLER, *Jnal f. Landw.*, t. XXXIII, 1885, p. 325.

2. DE VRIES, Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.

3. SCHINDLER, Ueber die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen der Papilionaceen, *Jnal f. Landw.*, t. XXXIII, 1885, p. 325.

4. VINES, On the relations between the formation of tubercles on the roots of Leguminosæ and the presence of nitrogen in the soil, *Ann. of Bot.*, t. II, 1884-1885, p. 386.

5. RAUTENBERG et KUHN, Vegetationsversuche in Lösungen, *Landw. Versuchsst.*, t. VI, 1864.

6. LAURENT, Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

cations latérales. Les Lupins se comportent d'une manière inverse.

MALPEAUX¹ a essayé de son côté l'action des nitrates sur la croissance des Légumineuses. Il a constaté que le nitrate de soude, mis en contact avec les graines exerce une influence nuisible sur la germination; son emploi dans les terres arables ordinaires, riches en azote, ne paraît pas nécessaire pour favoriser le début de la végétation des Légumineuses dont les nodosités s'organisent assez rapidement pour être en état de travailler lorsque les réserves de la graine sont épuisées. En outre, l'azote nitrique semble être assimilé directement par les plantes et provoque alors une absence totale ou relative des tubercules sur les racines d'espèces qui en sont normalement pourvues.

II. Influence de l'acide phosphorique. — D'après DE VRIES, SCHINDLER et VINES, l'absence de phosphates supprime l'aptitude des Légumineuses à produire des nodosités.

LAURENT² montre que l'addition de superphosphates stimule la production de ces organes chez le Pois, la Vesce velue et la Vesce cultivée et surtout chez le Lupin jaune.

Enfin WAGNER³ constate que 100 kilos d'acide phosphorique fournis à une culture de Vesce provoquent la fixation de 400 kilos d'azote atmosphérique.

III. Influence du calcaire. — FRUWIRTH⁴ a cherché l'influence du calcaire sur des cultures de Lupins inoculés ou non. Il a constaté que cette substance exerce sur le rendement une action défavorable.

HEINRICH⁵, en faisant pousser des Lupins dans une terre

1. MALPEAUX, Expériences sur la culture des Légumineuses, *Ann. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 65.

2. LAURENT, Observations sur le développement des nodosités radicales chez les Légumineuses, *C. R.*, t. CXXXIII, 1901, p. 1241.

3. WAGNER, Emploi des engrais minéraux pour favoriser la fixation de l'azote de l'air, *Deutsche landw. Presse*, t. XXII, 1895, p. 5.

4. FRUWIRTH, Neue Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, t. XVIII, 1892, p. 18 et 127. — Id., Dreijährigen Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, t. XIX, 1893, p. 6.

5. HEINRICH, Action de la chaux sur les Lupins, *Zweit. Ber. Landw. Versuchsst.*, 1894, p. 272.

sableuse additionnée ou non de calcaire, constate de meilleurs rendements dans la terre sans calcaire.

Par contre PASSERINI¹, ayant remarqué que la sidération avait donné en Toscane des résultats variables avec la nature des terres et supposant que leur richesse en calcaire exerce une influence décisive sur la croissance des Légumineuses, mit en expérience du Trèfle dans trois terres dont l'une était pauvre en calcaire, une deuxième en était privée, tandis que la troisième en renfermait une proportion notable. Après la récolte, on constata un gain d'azote uniquement dans la terre riche en calcaire, les autres ayant manifesté une légère perte.

DEHÉRAIN et DEMOUSSY², cultivant du Trèfle blanc dans des terrains de compositions diverses, remarquent que l'inoculation n'est pas avantageuse pour les terres dépourvues de calcaire; l'addition de cette substance est surtout utile lorsqu'on distribue en même temps un phosphate soluble ou un superphosphate; elle devient nuisible quand on ne répand pas de phosphate ou qu'on le donne sous forme de nodules, ces derniers ne présentant qu'une efficacité médiocre, bien inférieure à celle des scories de déphosphoration.

Les mêmes auteurs³ poursuivant leurs recherches sur la culture des Lupins, constatent que l'addition de calcaire aux sols siliceux où croît normalement le Lupin jaune exerce une action des plus défavorables; par contre le Lupin bleu qui est franchement silicicole s'accommode très bien de la présence de carbonate de chaux à condition de trouver en même temps de la silice dans le sol.

Enfin, BILWILLER⁴ partage les Légumineuses en deux groupes principaux et conseille de choisir l'un ou l'autre suivant la nature du sol à ensemercer. Sur les terres légères et sableuses, on cultivera les trois variétés de Lupins et la Serradelle; les

1. PASSERINI, Sur l'influence améliorante des Légumineuses dans des sols de compositions différentes, *Le Stazioni sperimentali*, t. XXX, 1897, p. 68.

2. DEHÉRAIN et DEMOUSSY, Étude sur les Légumineuses de grande culture. Culture du Trèfle blanc, *Ann. agr.*, t. XXVIII, 1902, p. 497.

3. Id., Recherches sur la végétation des Lupins; 2^e partie, Lupins bleus, *Ann. agr.*, t. XXVI, 1900, p. 169. — Id., Études sur les Légumineuses de grande culture; Lupins jaunes, *Ann. agr.*, t. XXVIII, 1902, p. 449.

4. BILWILLER, cité par MILLER, *Journal Roy. Agric. Soc. England*, 1896, p. 236.

terres calcaires recevront la Vesce et les Lotus. Sur les terres fortes on sèmera des Pois, du Trèfle et de la Fèverolle.

Il y a entre ces résultats une contradiction apparente qui s'explique aisément si l'on a recours aux expériences poursuivies par MAZÉ¹ en cultures artificielles et sur lesquelles nous nous sommes étendu précédemment. Cet auteur admet en effet que les Bactéries des nodosités peuvent se distribuer en deux groupes adaptés à une réaction déterminée du sol. Les unes, celles du Trèfle, par exemple, sont en quelque sorte calcicoles et s'accommodent mal de l'absence de calcaire; les autres (Genêt, Lupin, etc.) préfèrent les sols siliceux et l'addition de calcaire produit à leur égard des effets nuisibles.

IV. **Influence de la chaux vive.** — SALFELD² a étudié en 1894, l'action comparée de la chaux vive et de la marne sur la culture des Légumineuses dans une terre légère et sablonneuse additionnée l'année précédente de kaïnite et de scories. Il a constaté que les plantes venues sur terrain chaulé étaient, sauf de très rares exceptions, complètement dépourvues de nodosités et mal développées, tandis que celles qui poussaient sur le sol marné offraient une végétation luxuriante. Comme il était impossible de reconnaître chez les plantes chétives les symptômes d'une affection parasitaire, il était naturel de penser que la chaux vive avait tué ou tout au moins affaibli les Bactéries radicicoles présentes dans le sol.

BILWILLER³ admet, lui aussi, que la chaux exerce une action funeste sur les microorganismes des nodosités.

TACKE⁴, pour vérifier cette action nuisible, a procédé à des essais de végétation dans des pots contenant soit une terre analogue à celle de SALFELD, soit une terre tourbeuse. Dans aucun des deux cas la chaux ne s'est montrée contraire au développement des Bactéries ou des Légumineuses. TACKE

1. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XIII, 1899, p. 145.

2. SALFELD, Vernichtung der Leguminosenpilze durch Ätzkalk, *Deutsche landw. Presse*, t. XXI, 1894, p. 785.

3. BILWILLER, cité par MILLER, *Jnal Roy. Agric. Soc. England*, 1896, p. 423.

4. TACKE, Action de la chaux vive sur les Bactéries des tubercules des Légumineuses, *Centralbl. f. Agriculturchemie*, t. XXV, 1896, p. 297.

pense donc que le phénomène observé par SALFELD et BILWILLER doit être rapporté à une autre cause encore indéterminée.

V. Influence de l'humus. — DEHÉRAIN et DEMOUSSY¹ ont remarqué que les Lupins jaunes, semés dans du sable uniquement pourvu d'engrais minéraux, périssent ou végètent misérablement en l'absence de nodosités. Dans le même sol renfermant de l'humus, les Lupins poussent et fleurissent sans que leurs racines portent de nodosités; ils peuvent mûrir leurs graines, mais n'acquièrent cependant pas une grande vigueur. Dans ces conditions, les plantes vivent donc sans utiliser l'azote de l'air, en profitant uniquement de l'azote combiné du sol.

1. DEHÉRAIN et DEMOUSSY, Étude sur les Légumineuses de grande culture; Lupins jaunes, *Ann. agr.*, t. XXVIII, 1902, p. 449.

CHAPITRE VII

Essais d'inoculation des sols avec des cultures pures du Microbe des Légumineuses. — « Nitragine ».

Venant après les expériences agricoles qui avaient montré la nécessité de la présence des nodosités sur les Légumineuses pour la fixation de l'azote atmosphérique, l'isolement à l'état de pureté du Microbe fixateur devait inciter certains agronomes à tenter l'inoculation des sols, non plus avec des terres ayant porté des Légumineuses, mais bien avec des cultures pures de ce Microbe.

NOBBE et HILTNER¹, à la suite des isolements poursuivis avec succès par BEYERINCK, ont vu que l'organisme obtenu par ce savant donnait naissance sur les diverses Légumineuses à des variétés distinctes n'influençant plus que la plante qui les avait hébergés.

Ils ont pensé alors qu'il pourrait être avantageux pour les cultivateurs de trouver dans le commerce les ferments des plantes qu'ils désirent ensemer.

Sur leur demande, une maison allemande de Höchst-sur-Mein a entrepris en 1896 la préparation industrielle de cultures pures de Bactéries adaptées respectivement aux diverses Légumineuses. Ces cultures sont désignées sous le nom de *Nitra-*

1. NOBBE et HILTNER, Ueber die Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien der Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVII, 1896, p. 377. Voir aussi NOBBE, Opinion rapportée par WÆLCKER dans *Jnal Roy. Agric. Soc. England*, 1896, p. 253.

gine. Les Bactéries qu'elles renferment ont été isolées sur plaques de gélatine.

NOBBE et HILTNER ont ainsi préparé et mis dans le commerce des cultures d'organismes provenant de 17 Légumineuses différentes. Elles sont livrées en flacons de 300 centimètres cubes renfermant une gelée à base de gélose et remplie par une végétation blanchâtre de Bactéries. Il faut veiller à ce que le produit ne soit pas conservé à une température supérieure à 33° et soit maintenu à l'obscurité.

Chaque flacon peut servir pour l'inoculation d'un quart d'hectare environ. On l'emploie en chauffant vers 30° pour liquéfier la gélose, on dilue dans 1-3 litres d'eau, et on se sert du mélange pour arroser la quantité de semences nécessaire, ou mieux pour mélanger à de la terre que l'on répand sur le sol et que l'on enfouit à une faible profondeur.

A la suite de cette mise dans le commerce, de nombreux agronomes firent dans divers champs d'expérience des essais en vue de s'assurer de la valeur de la nitragine au point de vue de la grande culture. Nous nous bornerons à citer seulement les suivants :

WELCKER¹ a inoculé à la nitragine 11 Légumineuses différentes. Le traitement, soit des graines, soit du sol, n'a produit aucun effet. Les Pois et les Haricots présentaient cependant des racines un peu plus développées que ceux sans nitragine. WELCKER croit néanmoins que l'inoculation conduit à une formation plus régulière des tubercules.

FRUWIRTH² a choisi comme plante d'essai le Haricot qui, d'après NOBBE, réagit le plus facilement sous l'action des Bactéries provenant d'autres Légumineuses du même groupe. Il a ainsi constaté que l'effet de la nitragine s'est surtout fait sentir sur la récolte en paille, tandis que le rendement en grains était un peu moindre dans les parcelles inoculées que dans celles qui ne l'avaient pas été. Il reconnaît cependant que les écarts sont trop faibles pour que l'on puisse considérer les résultats comme démonstratifs.

1. WELCKER, Expériences sur l'emploi de la nitragine, *Jnal Soc. chem. Indust.*, t. XV, 1896, p. 767.

2. FRUWIRTH, Inoculation des sols avec la nitragine. *Deutsche landw. Presse*, 1897, n° 12.

De leur côté NOBBE et HILTNER¹ poursuivaient des essais sur la nitragine en plein champ. Ils ont examiné comparativement des cultures faites après inoculation ou sans inoculation. Ils ont ainsi constaté que même en terre non inoculée, on trouve toujours, dans leurs expériences, des tubercules sur les racines des plantes. Malgré cela, l'introduction de nitragine aurait eu pour effet d'augmenter le nombre et la grosseur de ces tubercules.

DEHÉRAIN² fait remarquer que l'emploi de la nitragine ne conduit pas à des résultats bien certains : en sol stérilisé, et après inoculation avec le produit venant directement d'Allemagne, il n'a jamais pu observer la présence de nodosités sur les racines, bien qu'il se fût toujours adressé à des cultures de Bactéries correspondant aux plantes en expérience.

Devant ces résultats peu favorables, NOBBE et HILTNER³ cherchent à préciser les moyens d'augmenter l'activité de la nitragine. D'après eux, cette matière présente, sur la terre d'inoculation, l'avantage de n'apporter avec elle aucun germe étranger nuisible. Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement de la nitragine et sa pénétration dans les racines paraît être la période critique et c'est lui qu'il faut s'ingénier à réduire en semant le mélange de graines nitraginées et de terre, préparé comme il a été dit plus haut, non immédiatement, mais après douze à vingt-quatre heures, c'est-à-dire quand les graines sont déjà ramollies. Il faut éviter que le mélange ne prenne une consistance gluante en y ajoutant de la terre sèche ou du sable et on répandra de préférence par un temps pluvieux.

A la même époque, FRANK⁴ entreprend, sous les auspices du Gouvernement prussien des recherches en vue d'établir la valeur exacte de la nitragine.

Les essais ont été faits dans douze stations dont quatre seu-

1. NOBBE et HILTNER, Sur l'action de la nitragine dans les champs, *Deutsche landw. Presse*, 1898, p. 3.

2. DEHÉRAIN, Analyse du travail précédent, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 183.

3. NOBBE et HILTNER, Wie lässt sich die Wirkung des Nitragins erhöhen? *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 447.

4. FRANK, Die bisher erzielten Ergebnisse der Nitraginimpfung, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 441.

lement ont observé des résultats positifs dans un très petit nombre d'expériences, toutes les autres ayant donné lieu à des insuccès. Si ces résultats sont exacts, il est clair que l'avenir de la nitragine est nul. Il est évident, en effet, que, dès qu'un sol contient assez de ferments fixateurs, il est superflu de lui en fournir. Or les sols dépourvus de ces ferments sont rares.

On conçoit cependant qu'on arrive à préparer des ferments plus actifs que ceux du sol, mais ici encore l'expérience a prouvé que ce résultat n'avait pas été atteint dans la nitragine commerciale. De même, les essais faits en sols vierges ont montré que, contrairement à ce qu'on était en droit d'espérer, l'action de la nitragine y est nulle, tandis que celle des ferments naturels des terres fertiles apportées comme inoculation est, au contraire, très énergique.

En résumé, les résultats des expériences de FRANK sont les suivants :

Il est possible, par un apport de ferments artificiels, d'activer dans certains cas la végétation et d'augmenter le rendement des Légumineuses, ainsi que quelques essais favorables en témoignent. Mais il manque à la nitragine quelque chose que possèdent les ferments du sol et c'est à cette absence que l'on doit les insuccès constatés.

MAZÉ¹ rapproche ces faits de ceux qu'il a observés dans ses expériences antérieures. Il a vu, en effet, que les Microbes qui peuplent les nodosités, lorsqu'ils se répandent dans le sol, perdent peu à peu leurs caractères et aussi la propriété d'assimiler l'azote gazeux et qu'ils ne peuvent ensuite se fixer de nouveau sur les Légumineuses que si certaines conditions sont réalisées. Il pense que lorsqu'on pratique l'inoculation du sol par les cultures pures des Microbes, ou bien ces Microbes, qui sont affaiblis dans les premiers temps par suite du changement de milieu, existent déjà en bon état dans la terre et on ne gagne rien à leur introduction, ou bien on les répand là où ils manquent et ils ne se développeront pas, parce que ce milieu ne leur convient pas et que les facteurs nécessaires à leur évolution biologique font défaut. C'est ce qui explique

¹. MAZÉ, Les microbes des nodosités des Légumineuses, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XIII, 1899, p. 145.

pourquoi on observe de meilleurs résultats en se servant de terres d'inoculation où ces conditions sont réalisées.

D'autre part SCHRIBAUX¹ a montré combien il est difficile, dans les conditions naturelles d'éviter l'envahissement des plantes par les Bactéries apportées par l'air ou le sol, par suite de l'extrême diffusion de ces organismes. Il est évident que le nombre des terres qui ne contiennent pas le Microbe des Légumineuses doit être extrêmement restreint.

Il serait alors plus logique d'exalter la vitalité de ces micro-organismes répandus à l'état saprophytique dans le sol au moyen de fumures, d'assolements ou de drainages appropriés, que d'introduire dans ce même sol un excès de Bactéries fixatrices non adaptées à cette vie nouvelle et ne devant pas y rencontrer les facteurs nécessaires pour leur développement normal.

Toutes ces considérations montrent combien est précaire l'avenir de la nitragine.

1. SCHRIBAUX, *Agriculture pratique*, I, 1897, p. 813.



CHAPITRE VIII

Des nodosités qui se rencontrent sur les racines de plantes appartenant à des familles autres que celle des Légumineuses.

On a signalé jusqu'ici la présence de nodosités radicales chez quelques plantes autres que les Légumineuses et principalement chez les *Alnus*, *Eleagnus*, *Hippophaë*, *Myrica*, *Podocarpus* et *Datisca*.

I. — TUBERCULES RADICAUX DES « ALNUS »

On trouve communément sur les racines d'*Alnus glutinosa* des excroissances en forme de verrues, adhérant aux racines et d'une coloration jaune brunâtre ou rouge brun. Ces excroissances, d'abord petites et peu nombreuses, ne tardent pas à prendre une apparence mamelonnée et les divers lobules se subdivisent d'une manière plus ou moins irrégulière. Il en résulte des masses dont la grosseur peut atteindre celle d'une pomme et qui sont composées d'une multitude de petits segments serrés les uns contre les autres.

La première mention de ces singulières productions a été faite en 1829 par MEYEN¹ qui les considérait comme des formations parasitaires ou *pseudomorphoses*.

SCHACHT² en donne une description détaillée, mais il hésite

1. MEYEN, Abhandlung über das Hervorwachsen parasitischer Gewächse aus den Wurzeln, *Flora*, 1829, p. 49.

2. SCHACHT, Der Baum, 1 vol., 1860, p. 172.

sur la nature de la cause déterminante et sur leur valeur morphologique.

ROOSMESSLER¹ n'est pas plus explicite à leur égard.

SAEGER² pense que ce sont des sortes de galles provoquées par la piqure d'un insecte.

WORONINE³ en fait une étude plus complète; il y remarque la présence de filaments mycéliens qu'il rapproche des *Schinzia* Næg. et qu'il désigne sous le nom de *Schinzia Alni*. Il admet la nature parasitaire de cet organisme.

BRUNCHORST⁴ pense également qu'il s'agit d'un vrai Champignon qui donnerait des hyphes septées et des sporanges terminaux.

MÖLLER⁵ tient d'abord le Champignon pour un *Plasmodiophora*, mais il ne tarde pas à changer d'avis⁶ et à se ranger à la manière de voir de BRUNCHORST qui est de même acceptée par FRANK⁷. Cependant CHODAT⁸ reprendra pour son compte, en 1900, l'opinion primitive de MÖLLER, et il fera de l'organisme un Myxomycète parasite, voisin du *Plasmodiophora Brassicae*.

VAN TIEGHEM et DOULIOT⁹ voient dans les tubercules des radicelles renflées en réservoirs nutritifs et polystéliques, analogues à celles des Légumineuses, mais ils ne précisent pas la nature des organismes qu'elles renferment.

La mycosymbiose des tubercules radicaux des *Alnus* devint

1. ROOSMESSLER, Der Wald, 1 vol., 1863, p. 418.

2. SAEGER, Ueber eine krankhafte Veränderung der Blütenorgane der Weintraube, *Flora*, 1863, p. 49.

3. WORONINE, Observations sur certaines excroissances que présentent les racines de l'Aune et du Lupin des jardins, *Ann. Sc. nat. Bot.* 5^e s., t. VII, 1867, p. 73.

4. BRUNCHORST, Ueber die Wurzelanschwellungen von *Alnus* und der Elaeagnaceen, *Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen*, t. II, 1, 1886, p. 162, 174.

5. MÖLLER, Ueber *Plasmodiophora Alni*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. III, 1885, p. 102.

6. MÖLLER, Beiträge zur Kenntniss der *Frankia subtilis*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 218.

7. CHODAT, Parasitisme et symbiose, *Actes Congr. Int. Bot.*, Paris, 1900, p. 23.

8. FRANK, Ueber die auf Verdauung von Pilzen abzielende Symbiose der mit endotrophen Mykorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. IX, 1891, p. 214.

9. VAN TIEGHEM et DOULIOT, Origine, structure et nature morphologique des tubercules radicaux des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 105.

intéressante lorsque les recherches de NOBBE et HILTNER¹ leur eurent attribué une fixation d'azote libre. Cependant la véritable nature du Champignon symbiote était toujours imparfaitement connue. Elle a été de nouveau étudiée par SHIBATA² qui reconnaît dans les tubercules la présence d'un Champignon analogue à celui qui habite les mycorhizes endotrophes

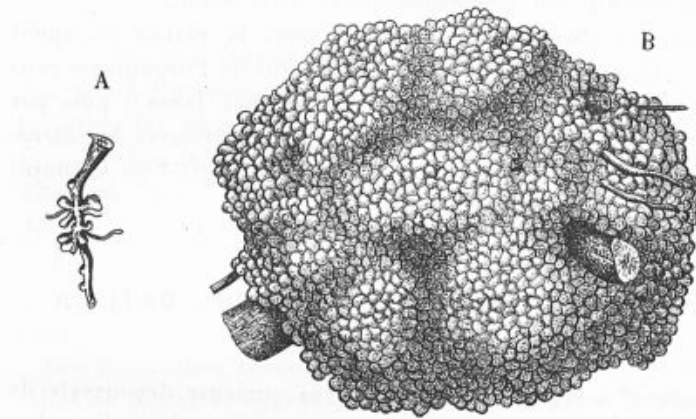


Fig. 19. — Nodosités d'*Alnus glutinosa*. — A, jeune; B, âgée. — Grandeur naturelle. (D'après Wronosine.)

des Orchidées, par exemple, mais qui ne serait pas un véritable Hyphomycète et tendrait à affecter des formes dissociées.

11. — TUBERCULES RADICAUX DES ÉLÆAGNACÉES, DES « MYRICA » ET DES « PODOCARPUS »

Les tubercules radicaux des Élæagnacées ont été presque toujours étudiés conjointement à ceux des *Alnus* et les travaux cités dans le paragraphe précédent s'appliquent également à eux. Les tubercules du *Myrica Gale* ont été signalés d'abord par BRUNCHORST³. Le Champignon qui les habite a été rap-

1. NOBBE et HILTNER, Vermögen auch Nichtleguminosen freien Stickstoff aufzunehmen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1895, p. 155.

2. SHIBATA, Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen, *Pringsheim's Jahrb.*, t. XXXVII, 1901-1902, p. 643.

3. BRUNCHORST, Ueber die Wurzelschwellungen von *Alnus* und den Elæagnaceen, *Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen*, II, 1, 1886, p. 162, 174.

porté par MÖLLER¹ au genre *Frankia*. SHIBATA a enfin étudié la cytologie de cet organisme dans les tubercules du *Myrica rubra*, où il lui a remarqué une tendance à prendre l'apparence des *Actinomyces*.

Les tubercules des racines de *Podocarpus* ont été vus par VON TUBEUF² chez *P. Nageia* et *P. neriifolia*. Ils étaient connus auparavant chez *P. chinensis*.

NOBBE et HILTNER³ en ont fait pour la plante un agent d'assimilation d'azote libre. La cytologie de l'organisme renfermé dans ces nodosités a été étudiée par JANSE⁴, puis par SHIBATA⁵ qui lui attribue une certaine analogie avec les *Streptothrix*. Il résulte de ces recherches qu'il s'agit d'un Champignon voisin de celui des *Alnus*.

III. — TUBERCULES RADICAUX DU « DATISCA CANNABINA »

TROTTER⁶ a signalé en 1902 la très curieuse découverte de nodosités radicales sur le *Datisca cannabina*, plante fort éloignée des Légumineuses, puisqu'elle appartient à une famille voisine des Aristolochiacées. Les tubercules se montrent toujours sur les jeunes racines latérales ou terminales; ils sont isolés ou groupés et lobés. Arrivés à leur complet développement, ils présentent à l'intérieur un parenchyme à parois minces avec cellules dont le noyau est fréquemment hypertrophié. On distingue aussi une région corticale dont les cellules sont plus grandes et allongées tangentiellement. Dans la région médullaire, les cellules ne renferment pas d'amidon, mais contiennent des amas de Bactéries colorables par la fuchsine et le violet de gentiane.

1. MÖLLER, Beiträge zur Kenntniss der *Frankia subtilis*, Ber. d. d. Bot. Ges., t. VII, 1889, p. 224.
2. VON TUBEUF, Die Haarbildungen der Coniferen, Sonderabdr. a. d. forst-naturw. Zeitschr., 1886, p. 224.
3. NOBBE et HILTNER, loc. cit.
4. JANSE, Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises, Ann. Jard. Buitenzorg, t. XIV, 1897, p. 67.
5. SHIBATA, loc. cit.
6. TROTTER, Intorno a tubercoli radicali di *Datisca cannabina*, Boll. d. Soc. bot. Ital., 1902, p. 50.

L'auteur se réserve de continuer l'étude de la morphologie et de la biologie de ces organes. Si cette découverte se confirme, elle constituera une intéressante contribution à l'étude de la fixation de l'azote.

DE L'ASSIMILATION PAR LES TUBERCULES RADICAUX DES NON-LÉGUMINEUSES

On a vu que NOBBE et HILTNER attribuent aux tubercules des non-Légumineuses le même pouvoir fixateur d'azote. Les résultats les plus favorables ont été obtenus avec le *Podocarpus chinensis*¹. Plusieurs pieds de cette plante cultivés à Tharend dans du sable sans azote, pendant cinq ans, se sont développés normalement comme ceux qui végétaient en pleine terre. NOBBE et HILTNER considèrent comme inadmissible qu'une plante puisse vivre aussi longtemps sur ses réserves azotées.

Les recherches récentes de STAHL² contredisent nettement celles de NOBBE et HILTNER. Cet auteur, à la suite de plusieurs années d'expériences arrive à admettre que les Champignons fournissent surtout à la plante des composés organiques, et cette hypothèse est corroborée par le contenu en cendres, moins élevé chez les plantes mycotrophes. La nature du substratum influe d'ailleurs sur le développement de la symbiose. Les sols pauvres en aliments salins et riches en humus sont particulièrement propres à la production des mycorhizes; au contraire, lorsque la composition du sol se modifie de façon que la nutrition directe des plantes (autotrophie) devienne facile, la mycotrophie tend à disparaître.

Peu après, SHIBATA³ ne se prononce pas sur le rôle exact joué par ces mycorhizes dans l'assimilation des éléments nutritifs par la plante support.

HILTNER⁴ revient sur cette question. Il s'accorde avec

1. NOBBE et HILTNER, Die endotrophen Mykorrhiza von *Podocarpus* und ihre physiologische Bedeutung, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 160.

2. STAHL, Der Sinn der Mycorrhizenbildung, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXXIV, 1899-1900, p. 539, trad. dans *Ann. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 113.

3. SHIBATA, *loc. cit.*

4. HILTNER, Beiträge zur Mycorrhizenfrage, *Naturw. Zeitschr. f. Land und Fortswirts.*, t. I, 1903, p. 9.

SHIBATA pour admettre que le Champignon des tubercules n'est pas un Hyphomycète vrai, mais il considère avec FRANK les articles dissociés des filaments comme des formes bactéroïdes de dégénérescence et non comme des productions sporangiales ainsi que le supposait SHIBATA.

D'après lui, il pourrait, au point de vue de l'assimilation, se présenter deux cas extrêmes : ou bien la plante résorbe complètement les organismes producteurs des tubercules qui, dans ce cas, n'ont pas grande valeur comme agents de fixation ; ou encore, dans un second cas, il n'y a pas résorption des Bactéroïdes, parce que ceux-ci se défendent de cette destruction en cédant à la plante l'azote extrait de l'air au lieu de leur propre substance qui serait digérée par les enzymes de la plante.

HILTNER considère ainsi la symbiose comme un combat dont le résultat final tient à l'état de nutrition de la plante et, d'autre part, à la virulence des Bactéries.

Quant à la résorption des filaments producteurs des nodosités vue par SHIBATA, HILTNER l'explique en admettant que l'auteur s'est servi de matériaux se trouvant dans le premier des cas cités précédemment.

VON TUBEUF¹ se range à la manière de voir de STAHL et attribue surtout aux mycorhizes la propriété de servir à l'assimilation des matières humiques. Il insiste sur l'analogie qui se rencontre avec les tubercules des Légumineuses, lorsque ceux-ci deviennent superflus dans le cas d'une nutrition abondante en nitrates, ce qui aurait lieu également pour les mycorhizes ectotrophes.

On voit combien ces opinions sont contradictoires, et l'on peut dire hardiment que tout est à refaire dans l'histoire de l'assimilation avec le concours des mycorhizes.

1. VON TUBEUF, Beiträge zur Mycorrhizafrage, *Naturw. Zeitschr. f. Land und Forstwirtschaft*, t. I, 1903, p. 67.

CHAPITRE IX

Assimilation de l'Azote par les Algues vivant en symbiose avec certaines Bactéries.

A la suite des premières observations de BOUSSINGAULT et de G. VILLE, quelques expérimentateurs se sont demandé si les Algues microscopiques jouaient un rôle dans l'assimilation directe de l'azote gazeux. LAURENT¹ et MORREN² admettent alors que ces organismes sont incapables de produire une telle fixation.

La question est délaissée ensuite pendant de nombreuses années. C'est après les travaux de BERTHELOT, montrant que la stérilisation des sols en expérience arrête toute fixation d'azote libre et laissant entrevoir ainsi l'action des microorganismes, qu'elle reprend quelque actualité.

Mais, tandis que BERTHELOT, dans ses premières communications sur ce sujet³, ne précise pas la nature des microorganismes fixateurs, FRANK⁴ attribue les gains d'azote aux Algues microscopiques distribuées en grand nombre dans les couches supérieures de la terre et qui le lui cèdent lors de leur mort. Dans ses expériences, ces Algues étaient représentées par deux Oscillaires, le *Chlorococcus humicola*, peut-être un *Pleuro-*

1. LAURENT, Recherches physiologiques sur les animalcules des infusions végétales comparées aux organes élémentaires des végétaux, Paris, 1854.

2. MORREN, Sur l'absorption de l'azote par les animalcules et par les Algues, *C. R.*, t. XXXVIII, 1854, p. 932.

3. BERTHELOT, Sur quelques conditions générales de la fixation de l'azote par la terre végétale, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XIV, 1888, p. 473.

4. FRANK, Untersuchungen über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff und über den Kreislauf desselben in der Landwirtschaft, *Landw. Jahrb.*, t. XVII, 1888, p. 421. — Id., Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffes durch erdbodenbewohnende Algen, *Ber. d. d. Bot. Gesell.*, t. VII, 1889, p. 34.

coccus, ainsi que quelques protonémas de Mousses; les sols étaient un sable mouvant de la Marche, additionné de kaïnite et de scories de déphosphoration et, d'autre part, le même sable marné. Au bout de 134 jours, on pouvait noter, pour un poids de terre de 9 950 grammes, des gains d'azote de 25,27 p. 100 sur le sol non marné et de 36,09 p. 100 sur le sol marné. Cet accroissement se produit, dans le premier cas complètement, dans le second pour la plus grande partie, sous forme de composés azotés organiques, résultat concordant avec celui obtenu par BERTHELOT sur les terrains argileux.

D'autre part, en opérant sur des sols stérilisés par lixiviation à l'eau bouillante, FRANK remarque que, ni la porosité du sol, ni même son aération n'ont, à la température ordinaire, le pouvoir de produire à eux seuls une fixation de l'azote élémentaire. Il n'en serait plus de même aux températures élevées, 50 à 100°, par exemple; mais, dans les conditions ordinaires, l'enrichissement du sol serait dû uniquement à des phénomènes n'ayant aucune relation avec ceux qui se produisent dans sa profondeur.

A. GAUTIER et DROUIN¹, admettent également que les organismes unicellulaires aérobies, particulièrement certaines Algues, interviennent dans le phénomène de la fixation sur le sol, même privé de toute autre végétation et exempt de matière organique.

FRANK² revient sur ce sujet en 1891; il enseme avec des Algues vertes unicellulaires des matras contenant une couche de sable blanc siliceux calciné, dépourvu de nitrates et d'ammoniaque et additionné d'une solution nutritive sans azote. Après l'ensemencement, il voit les Algues envahir peu à peu toute la masse du sable et l'enrichir en azote combiné. La lumière solaire et une température moyenne étaient indispensables.

SCHLÆSING fils et LAURENT³ constatent à leur tour que cer-

1. A. GAUTIER et DROUIN, Recherches sur la fixation de l'azote par le sol et les végétaux, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 754, 863, 944, 1098, 1232, 1605.

2. FRANK, Inwieweit ist der freie Luftstickstoff für die Ernährung der Pflanzen verwertbar? *Deutsche landw. Presse*, 1891, p. 779.

3. SCHLÆSING fils et LAURENT, Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 776.

taines Algues (*Conferva*, *Oscillaria*, *Nitzschia*) peuvent déterminer dans le sol où elles croissent des gains d'azote, c'est-à-dire peuvent être considérées comme fixant cet élément.

Dans d'autres expériences effectuées l'année suivante, les mêmes auteurs¹ ont utilisé une terre naturelle pourvue autant que possible des divers organismes vivants qui se rencontrent dans les bonnes terres. On y a cultivé des Topinambours, de l'Avoine, ainsi que des Pois comme témoins. On plaçait en outre dans les mêmes conditions trois sols sans culture entièrement semblables.

Dans une première série d'essais, la surface de tous les sols s'est couverte à des degrés variables de plantes vertes inférieures, mais, pour deux des témoins, le développement de ces plantes a été très faible. Or dans toutes les expériences, sauf ces deux-là, on a pu noter une absorption d'azote gazeux. Dans l'une d'elles, sans plantes supérieures, le sol s'est couvert d'une notable quantité d'Algues, et on a pu remarquer que la totalité de l'azote fixé se trouvait dans ces végétaux.

Dans une deuxième série d'essais, on a réussi à éviter la production des plantes inférieures en recouvrant les sols ensemencés et contaminés par une couche de sable quartzeux calciné. Dès lors on n'a plus constaté de fixation.

SCHLÆSING fils et LAURENT² reprennent alors leurs recherches en mettant en œuvre, non plus des sols pauvres, mais une bonne terre naturelle, dans laquelle ils introduisent une dose assez importante de nitrate de potassium. Ils se sont efforcés en outre de faire des cultures d'Algues moins complexes que précédemment et même pures.

Dans les deux premières expériences, on a fait usage de la terre pourvue de nitrates et ensemencée avec quelques centimètres cubes d'une délayure de 5 à 6 bonnes terres de jardin.

Sur ces terres il a poussé principalement un mélange de *Nostoc punctiforme* Har. et de *Nostoc minutum* Desm. On rencontrait en outre quelques amas incolores formés de débris de

1. SCHLÆSING fils et LAURENT, Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 732.

2. SCHLÆSING fils et LAURENT, Recherches sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, 1892, p. 65.

Nostoc envahis par des Bactéries et aussi quelques colonies de *Cylindrospermum majus* Kütz. et quelques fragments de protonémas de Mousses. Après six mois, on a constaté une importante fixation d'azote.

Les auteurs firent alors deux nouvelles expériences dans lesquelles on prenait comme sol du sable quartzeux calciné, sans nitrates et additionné d'une trace de délayure de terre. L'un des vases était, au bout de cinq mois, couvert d'une culture presque pure de *Nostoc punctiforme* avec seulement quelques petits amas de cellules mortes accompagnées de Bactéries. Le second vase, bien que couvert de *Nostoc punctiforme* contenait en outre une colonie de *Phormidium papyraceum* et un peu de *Nostoc minutum*. Dans les deux cas, il y eut gain d'azote.

Par contre, une terreensemencée avec une culture presque pure de *Microcoleus vaginatus* accompagné de quelques Oscillaires n'a pas fixé d'azote. SCHLÆSING fils et LAURENT se demandent si ce résultat négatif ne tient pas au degré de pureté plus grand de la culture d'Algues, ce qui serait défavorable au cas où la fixation résulterait du concours de plusieurs êtres. Ils pensent de plus que, contrairement à l'opinion de BERTHELOT, la fixation d'azote sur le sol est réalisée uniquement à la surface du sol, suivant le processus qui vient d'être exposé, et non dans la profondeur, mais BERTHELOT¹ fait remarquer que les Algues ne sont pas seules à présenter cette propriété et que, si elles agissent en surface, il peut y avoir d'autres organismes fixant en profondeur, pourvu qu'il y ait accès d'oxygène, ainsi que l'établissent ses observations antérieures.

Ce même auteur², poursuivant des recherches sur la fixation de l'azote sur les matières humiques, observe également un gain en présence d'une végétation d'organismes inférieurs. Il utilisait de l'acide humique naturel extrait d'un sol de Meudon par digestion à froid et précipitation par l'acide chlorhy-

1. BERTHELOT, Remarques relatives à la communication de SCHLÆSING fils et LAURENT, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 778.

2. BERTHELOT, Nouvelles recherches sur la fixation de l'azote atmosphérique par les microorganismes. Emploi des matières humiques, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XXX, 1893, p. 411.

drique; cet humus contenait 3,61 p. 100 d'azote. 5 grammes de cette substance furent introduits dans un flacon de 6 litres rempli d'air et additionnés de 5 centilitres d'eau distillée et d'une trace d'eau tenant en suspension des végétaux inférieurs verdâtres. Après quatre mois, on a constaté un gain d'azote de 6 p. 100. Une deuxième expérience analogue en présence d'une plus grande quantité d'eau a donné un gain de 9 p. 100. Enfin, dans un troisième essai, en air non filtré, il s'est développé spontanément des Moisissures et des végétations diverses, les unes vertes et les autres blanchâtres; le gain a été de 30,3 p. 100.

A la même époque, KOCH et KOSSOWITSCH¹ reprenaient les recherches de FRANK et arrivaient à des résultats analogues.

KOSSOWITSCH² revient de nouveau l'année suivante sur cette question. Il se demande si les expérimentateurs qui l'ont précédé n'ont pas commis des erreurs d'interprétation par suite de l'impureté de leurs cultures. Il a réussi à obtenir à l'état pur le *Chlorella vulgaris*. Il a pu vérifier ainsi que les Algues ne se développent pas en l'absence de nitrates, même si on leur donne du sucre. Dans aucun cas, il n'y a eu de fixation d'azote, ce qui montre bien que ce sont les Microbes associés aux Algues qui interviennent ici.

D'ailleurs, dans les cultures associées, la présence du sucre joue un rôle actif dans la fixation, comme l'ont montré les essais suivants : divers mélanges d'Algues et de Bactéries ont été ensemencés dans les fioles contenant du sable imprégné d'un engrais minéral avec ou sans sucre. A la fin de l'expérience, les gains d'azote observés ont été :

Espèces prédominantes.	Sans sucre.	Avec sucre.
<i>Cystococcus</i> , <i>Phormidium</i> , Bactéries, Mucédinées.	7,1	9,5
<i>Cystococcus</i> et Bactéries.....	3,1	8,1
<i>Stichococcus</i> et Bactéries.....	2,3	2,7
<i>Nostoc</i> , <i>Scenedesmus</i> , Bactéries.....	?	19,1
<i>Nostoc</i> , Bactéries.....	8,8	25,4

1. KOCH et KOSSOWITSCH, Ueber die Assimilation von freien Stickstoff durch Algen, *Bot. Zeit.*, t. LI, 1893, II, p. 321.

2. KOSSOWITSCH, Untersuchungen über die Frage ob die Algen freien Stickstoff fixiren, *Bot. Zeit.*, t. LII, 1894, I, p. 97.

Il est clair que le sucre joue ici le même rôle que dans les expériences de WINOGRADSKY et, si l'on veut interpréter le mécanisme de la fixation dans les cultures non additionnées de cette substance, on est conduit à admettre que le phénomène est sous la dépendance des hydrates de carbone qui se trouvent dans le sol, qu'ils y soient amenés par les cellules mortes des Algues et des Bactéries ou qu'ils s'y rencontrent de toute autre manière. Cet enrichissement en azote des milieux de culture, proportionnellement au sucre consommé, est bien plus important dans les cultures de KOSSOWITSCH qu'elles ne l'avaient été dans celles de WINOGRADSKY. Cette proportion est en effet de 1/200. La raison de cette différence semble résider dans ce fait que tout le sucre est brûlé intégralement par les Bactéries qui nous occupent, tandis que le *Clostridium* en transforme une partie en acide butyrique seulement et lui emprunte par conséquent une somme moindre d'énergie.

Les principaux résultats obtenus par KOSSOWITSCH sont confirmés par KRÜGER¹ qui montre que deux Algues : *Chlorella protothecoides* Krüg. et *Chlorothecium saccharophilum* Krüg. ne peuvent se développer dans des solutions nutritives privées d'azote combiné. C'est une preuve indirecte de la non-assimilation de l'azote atmosphérique.

BOUILHAC², reprenant les recherches de KOSSOWITSCH, isole trois Algues : *Ulothrix flaccida*, *Nostoc punctiforme* et *Schizothrix lardacea*. Il les cultive dans deux solutions, la première de la formule suivante :

Eau distillée.....	1 litre.
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 20
Sulfate de potasse.....	0 gr. 20
Phosphate neutre de potasse.....	0 gr. 20
Carbonate de chaux.....	0 gr. 1
Perchlorure de fer.....	traces.
Azotate de chaux.....	1 gramme.

Le deuxième de même composition sans nitrate de chaux.

1. KRÜGER, Die neuesten Forschungen der Landwirtschaftlichen Bakteriologie, *Jahrb. d. D. Landw. Ges.*, t. XV, 1900.

2. BOUILHAC, Recherches sur la végétation de quelques Algues d'eau douce, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 561.

Dans ces conditions, aussi bien en présence qu'en l'absence de Bactéries, l'*Ulothrix* et le *Schizothrix* refusent de pousser dans les liquides sans nitrate de chaux.

Il n'en est pas de même du *Nostoc punctiforme*; ce dernier ne pousse pas en l'absence de Bactéries, mais en leur présence, l'association provoque le développement simultané des deux organismes et la fixation de l'azote se manifeste avec la netteté qu'indique le tableau suivant :

	Récoltes.	Azote p. 100 Azote fixé, de matière sèche.	
Avec nitrate; <i>Nostoc</i> et Bactéries.	0 gr. 705	23 mgr. 4	3,3
Sans nitrate; <i>Nostoc</i> et Bactéries.	0 gr. 564	20 mgr.	3,5
Sans nitrate; <i>Nostoc</i> , filaments d' <i>Hypheothrix</i> et Bactéries . . .	0 gr. 353	11 mgr. 1	3,1

Or les cellules de *Nostoc* ont ceci de particulier qu'elles sont entourées d'une couche glaireuse sur laquelle les Bactéries se multiplient rapidement. Il est vraisemblable que c'est grâce à cette glaire que les Bactéries disposent des matières organiques qui leur sont indispensables. BOUILHAC pense qu'en la brûlant, elles constituent la combinaison azotée dont la plante fera ensuite son profit.

Un autre point mérite encore de fixer l'attention. La teneur en azote du *Nostoc* (3,4 p. 100 de la matière sèche) est notablement supérieure à celle des plantes de grande culture, les Légumineuses excepté. Or, ces dernières prospèrent grâce aux Bactéries de leurs nodosités. A ce point de vue, il y a donc un intéressant rapprochement à faire entre le *Nostoc* et les Légumineuses.

Il n'a pas été possible à BOUILHAC, même par l'emploi des arsenicaux, de séparer le *Nostoc* des Bactéries qui l'accompagnent.

La non-fixation de l'azote atmosphérique par les Algues en l'absence de Bactéries a été confirmée par KRÜGER et SCHNEIDWIND¹ et par CHARPENTIER².

1. KRÜGER et SCHNEIDWIND, Sind niedere chlorophyllgrüne Algen imstande, den freien Stickstoff der Atmosphäre zu assimilieren und den Boden an Stickstoff zu bereichern? *Landw. Jahrb.*, t. XXIX, 1900, p. 771.

2. CHARPENTIER, Alimentation azotée d'une Algue, le *Cystococcus humicola*, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, 1903, p. 321.

De son côté, BEYERINCK¹, après avoir isolé son *Azotobacter chroococcum*, a essayé d'étudier la symbiose entre des cultures pures de cet organisme et diverses Algues inférieures, Chlorophycées ou Cyanophycées. Il n'a obtenu jusqu'ici aucun résultat.

Nous n'abandonnerons pas cet intéressant sujet de la fixation de l'azote par la symbiose des Algues et des Bactéries sans mentionner un récent travail de BOUILHAC et GIUSTINIANI² qui montre de quelle importance est le phénomène pour la grande culture.

Ces auteurs se sont demandé si, pour cultiver les plantes supérieures, on ne pourrait pas remplacer les engrais azotés par des associations de cette nature. Les sols, dans leur expérience, étaient formés de sable siliceux et les Algues étaient un mélange de *Nostoc punctiforme* et d'*Anabaena* recouvert de Bactéries. Deux sols (n^{os} 2 et 3) pourvus d'un engrais sans azote et de carbonate de chaux furent ensemencés simultanément avec des graines de Sarrasin et un mélange d'Algues et de Bactéries. Un autre pot (n^o 1) reçut seulement du Sarrasin. Or, tandis que la plante poussait très vigoureusement dans les sols 2 et 3, elle demeurait languissante dans le sol 1. Après six semaines, on fit la récolte et on y dosa l'azote.

	Matière sèche.	Azote de la récolte.
Pot n ^o 1.....	1 gr. 10	29 mgr. 24
Pot n ^o 2.....	3 gr. 75	71 mgr. 55
Pot n ^o 3.....	7 gr. 10	127 mgr. 27

Ces expériences montrent avec quelle rapidité les Algues recouvertes de Bactéries et végétant dans un sol dépourvu de matières organiques l'enrichissent en azote; elles montrent de plus que cette fixation a été suffisante pour satisfaire aux besoins du Sarrasin.

1. BEYERINCK, Ueber oligonitrophile Mikroben, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 561.

2. BOUILHAC et GIUSTINIANI, Sur une culture de Sarrasin en présence d'Algues et de Bactéries, *C. R.*, t. CXXXVII, 1903, p. 1275.

Les Mousses microscopiques sont-elles capables de fixer l'azote libre?

Une semblable question pouvait se poser à la suite des premières expériences de SCHLÆSING fils et LAURENT¹. Sur les sols riches dont ils faisaient usage, il s'était développé quelques protonémas de Mousses, principalement de *Barbula muralis* et de *Brachytecium rutabulum*, à côté du *Nostoc* envahi par les Bactéries. Le résultat de ce développement avait été un gain d'azote.

Les mêmes auteurs ont alors essayé de cultiver à un état de pureté assez grand les Mousses observées en repiquant des colonies à peu près pures. Dans ces conditions, il ne s'est plus produit de fixation.

Les Moisissures considérées comme agents de fixation.

La première mention du rôle fixateur possible des Moisissures est due à BOUSSINGAULT² qui constate que, pendant la végétation des mycodermes et en particulier du *Penicillium glaucum* au sein d'un liquide fertile, il n'y a pas fixation d'azote.

Plus tard, JODIN³ admet que des végétations mycodermiques, placées avec du sucre, de l'acide tartrique, de la glycérine, des phosphates, etc., en vases scellés et en présence d'une atmosphère artificielle d'oxygène et d'azote, absorbent une proportion très notable de ce dernier gaz, pouvant aller jusqu'à 6 et 7 p. 100 du volume de l'oxygène consommé simultanément.

1. SCHLÆSING fils et LAURENT, Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 776; *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 732; *Ann. Inst. Pasteur*, t. VI, 1892, p. 824.

2. BOUSSINGAULT, La terre végétale considérée dans ses effets sur la végétation, *Agronomie*, t. I, 1858, p. 340.

3. JODIN, Du rôle physiologique de l'azote, *C. R.*, t. LV, 1862, p. 612.

PASTEUR¹, puis NÆGELI² trouvent, au contraire, que, si l'on offre à des Moisissures et à des Levures un aliment complet sans azote, ces Champignons se développent faiblement, mais que leur teneur en azote subit une légère diminution.

Les études sur ce sujet n'ont été reprises que récemment.

FRANK³ a cultivé du *Penicillium glaucum* dans des matras fermés contenant une solution nutritive dépourvue d'azote. De temps en temps, il renouvelait l'atmosphère du matras avec de l'air ayant barboté dans de l'acide sulfurique. Dans ces conditions, le Champignon se développe et fixerait de l'azote, mais la croissance devient plus rapide si on lui fournit en outre de l'azote combiné, de l'asparagine, par exemple.

D'autre part, BERTHELOT, à la suite d'expériences dans lesquelles il avait observé un enrichissement des sols consécutif au développement d'un mélange de Moisissures et d'autres végétaux inférieurs, essaie de préciser le phénomène.

Il ensemente⁴ de l'*Aspergillus niger* dans du liquide de COHN maintenu dans des ballons de 600 centimètres cubes, bouchés au coton et stérilisés, ou bien dans des cristallisoirs disposés sous des cloches rodées. Ces cultures étaient mises à l'étuve à 20-25°; certaines étaient disposées dans un champ électrique. Les résultats suivants ont été obtenus :

Mélange.	Vases.	Durée.	Azote initial.	Azote final.	Gain p. 100.
Non ensemené.	Ballon.	1 mois.	24,9	24,4	0
Ensemené	—	—	24,9	31,9	26
—	Cristallisoir.	—	27,1	32,9	22
—	—	—	27,1	37,1	37
—	—	—	27,1	32,1	18
—	—	—	27,1	36,9	35

(placés dans
un champ
électrique.

On voit : 1° que l'action du champ électrique n'a pas produit d'effet sensible; 2° qu'il y a eu des gains d'azote.

1. PASTEUR, Mémoires sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère (Chap. IX, p. 106), *Ann. Ch. et Ph.*, 3^e s., t. LXIV, 1862, p. 5 et suiv.

2. NÆGELI, Ernährungsschemismus der niedere Pilze, *Sitz. München. Akad.*, juill. 1879.

3. FRANK, Inwieweit ist der freie Luftstickstoff für die Ernährung der Pflanzen verwertbar? *Deutsche landw. Presse*, 1891, p. 779.

4. BERTHELOT, Recherches nouvelles sur les microorganismes fixateurs d'azote, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 842. *Id.*, *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XXX, 1893, p. 419.

Mais les milieux de BERTHELOT n'étaient pas ensemencés purement, car il s'y est développé des organismes étrangers, et, dans une autre série d'expériences où les gains ont été supérieurs, les cultures étaient encore moins pures. La même remarque doit s'appliquer à une culture d'*Alternaria tenuis* et à une de *Gymnoascus* qui ont aussi donné lieu à des absorptions d'azote.

Par contre, WINOGRADSKY¹ n'observe aucune fixation avec l'*Aspergillus* et une autre Moisissure indéterminée, cultivés purement.

PRURIWITSCH² entreprend de nouvelles expériences sur l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum*. Il les cultive dans un milieu minéral additionné de sucre de canne et d'acide tartrique, convenablement stérilisé et analysé au préalable pour connaître sa teneur en azote.

A la fin de l'expérience, c'est-à-dire deux mois après l'ensemencement, le contenu des vases, récolte et liquide nutritif, a été analysé de nouveau et, dans tous les cas, a manifesté un enrichissement en azote. PRURIWITSCH a de plus remarqué que la quantité d'azote fixée était supérieure au poids sec du Champignon, et qu'elle est directement proportionnelle au poids de sucre contenu dans la liqueur. Il suppose alors qu'il se produit avec les Moisissures des phénomènes analogues à ceux que WINOGRADSKY a mis en lumière pour les Bactéries.

Quelques années plus tard, BREFELD³, dans ses recherches sur l'assimilation de l'azote chez les Champignons filamenteux, a obtenu des résultats négatifs avec ce gaz libre. Il en est de même de GERLACH et VOGEL⁴.

SAÏDA⁵ fait à son tour des expériences sur *Phoma betæ*, *Mucor stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Endococcus purpurascens*,

1. WINOGRADSKY, Absorption par les microorganismes de l'azote libre de l'air, *Arch. des Sc. biol. de l'Inst. imp. de Méd. exp. de St-Petersbourg* (édit. franç.), t. III, fasc. IV, 1895, p. 297.

2. PRURIWITSCH, Ueber die Stickstoffassimilation bei den Schimmelpilze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. XIII, 1895, p. 342.

3. BREFELD, Versuche über die Stickstoffaufnahme bei den Pflanzen, *Jahresb. d. Schles. Ges. f. vaterl. Cultur*, 15 nov. 1900.

4. GERLACH et VOGEL, Weitere Versuche mit stickstoffbindende Bakterien *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 636.

5. SAÏDA, Ueber die Assimilation freien Stickstoffs durch Schimmelpilze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. XIX, 1901, p. (107).

Acrostalagmus cinnabarinus, *Monilia variabilis* et *Fusisporium moschatum* cultivés dans un liquide minéral additionné de sucre de canne, de dextrose, ou de substances azotées diverses : carbonate, sulfate ou azotate d'ammoniaque, asparagine, peptone. Il constate que le *Phoma betæ*, le *Mucor stolonifer* et l'*Aspergillus niger* assimilent l'azote atmosphérique, aussi bien en présence qu'en l'absence de combinaisons azotées ; l'*Endococcus* l'assimile seulement en présence de peptone ou d'un mélange de carbonate d'ammoniaque et de dextrose, enfin l'*Acrostalagmus*, le *Monilia* et le *Fusisporium* n'assimilent dans aucun des milieux employés. Comme PRURIEWITSCH l'a montré, l'intensité de la fixation serait en raison directe de la concentration en sucre du milieu : lorsque cette substance est peu abondante, il ne se produit plus d'assimilation. Il en est de même quand la solution contient trop d'azote combiné. Enfin le phénomène se manifeste seulement bien à la lumière diffuse.

Nous signalerons enfin, pour terminer, une Note publiée par HILTNER¹ d'où il semblerait résulter que le mycélium qui se rencontre dans la couche hyaline du fruit de *Lolium temulentum* serait susceptible jusqu'à un certain point d'occasionner une plus-value dans le bilan d'azote de la plante.

Les mémoires qui viennent d'être passés brièvement en revue aboutissent, on le voit, à des résultats assez vagues et contradictoires. Il y aurait certainement lieu de reprendre ces études afin de préciser l'action réelle des Champignons microscopiques vis-à-vis de l'azote atmosphérique.

1. HILTNER, Ueber die Assimilation des freien atmosphärischen Stickstoffs durch in oberirdischen Pflanzenteilen lebende Mycelien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2. Abt., t. V, 1899, p. 831.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ADUCCO. — L'assimilazione dell' azoto e la coltura siderale, 1 br. in-8°, 25 p., Casale, 1889.
- EBY. — Beitrag zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVI, 1896, p. 409-439.
- AITKEN. — Versuche mit Nitragin, *Chem. Centralbl.*, 1899, I, p. 1258.
- ALPE et MENOZZI. — Studi e ricerche sulla questione dell' assimilazione dell' azoto per parte del piante, *Boll. del Min. d'Agric., Ind. e Com.*, 1892, n° 14.
- ANDRÉ. — Azote, *Dict. de Physiol.* de RICHER, 1895, p. 961.
- ARMSBY. — L'azote du sol, *Proceed. of the Amer. Ass. f. the Adv. of Sc.*, 1874. Résumé dans *Ann. agr.*, t. II, 1876, p. 141.
- ATKINSON. — Contribution to the biology of the organism causing leguminous tubercles, *Bot. Gaz.*, t. XVIII, 1893, p. 157, 226, 257.
- ATWATER. — On the acquisition of atmospheric nitrogen by plants, *Amer. Chem. Jnal.*, t. VI, 1884-85, p. 365.
- ATWATER et WOODS. — The acquisition of atmospheric nitrogen by plants, *Amer. Chem. Jnal.*, t. XIII, 1891, p. 42.
- BALDINI. — Sopra alcune produzioni radicali del genere *Podocarpus*, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 474.
- BARANETSKY. — Sur l'assimilation de l'azote libre par les plantes, *Bull. Univ. Imp. de St-Wladimir* (Kiew), 1894 (en russe).
- BÄSSLER. — Impfversuche mit Nitragin, *Jahresb. Versuchsst. Köslin*, 1896, p. 28.
- BAYER et C^{ie}. — Impfung von Ackerböden mit Bodenbakterien, *Bl. f. Zuckerrübenbau*, 1901, p. 217.
- BENECKE. — Ueber die Knöllchen an den Leguminosen Wurzeln, *Bot. Centralbl.*, t. XXIX, 1887, p. 53.
- BENKOWICH. — Zur Theorie des Assimilationsprocess in der Pflanzenwelt, *Poggendorff's Annal.*, t. CLIV, 1875, p. 468.
- BERTHELOT. — Sur l'absorption de l'azote libre par les matières organiques à la température ordinaire, *C. R.*, t. LXXXII, 1876, p. 1283 et 1357.
- BERTHELOT. — Sur l'absorption de l'azote libre par les principes immédiats des végétaux sous l'influence de l'électricité atmosphérique, *C. R.*, t. LXXXIII, 1876, p. 676.

BERTHELOT. — Fixation de l'azote sur les matières organiques et formation de l'ozone sous l'influence de faibles tensions électriques, *C. R.*, t. LXXXV, 1877, p. 173. — Id., *Ann. Ch. et Ph.*, 5^e s., t. X, 1877, p. 51; t. XII, 1877, p. 453.

BERTHELOT. — Fixation directe de l'azote par certains terrains argileux, *C. R.*, t. CI, 1885, p. 775.

BERTHELOT. — Sur la fixation directe de l'azote gazeux de l'atmosphère par les terres végétales, *C. R.*, t. CIV, 1887, p. 205 et 625.

BERTHELOT. — Sur quelques conditions générales de la fixation de l'azote par la terre végétale, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 569. — Id., *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XIV, 1888, p. 473.

BERTHELOT. — Observations sur la fixation de l'azote par certains sols et par certaines terres végétales, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 1049.

BERTHELOT. — Expériences nouvelles sur la fixation de l'azote par certaines terres végétales et par certaines plantes, *C. R.*, t. CVII, 1888, p. 372.

BERTHELOT. — Sur la fixation de l'azote par les oxydations lentes, *C. R.*, t. CVIII, 1889, p. 543.

BERTHELOT. — Fixation de l'azote par la terre végétale nue ou avec le concours des Légumineuses, *C. R.*, t. CVIII, 1889, p. 700.

BERTHELOT. — Remarques sur les conditions où s'opère la fixation de l'azote par les terres argileuses, *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 277.

BERTHELOT. — Recherches sur la fixation de l'azote par les terres végétales. Influence de l'électricité, *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 281.

BERTHELOT. — Sur la fixation de l'azote atmosphérique, *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 345.

BERTHELOT. — Travaux de la station de Chimie agricole de Meudon (1883-1889), *Ann. Sc. agr.*, 7^e an., 1890, t. I, p. 353.

BERTHELOT. — Observations sur la Note de SCHLÆSING fils et LAURENT : Sur la fixation de l'azote libre par les Légumineuses, *C. R.*, t. CXI, 1890, p. 753.

BERTHELOT. — Remarques relatives à la Communication de SCHLÆSING fils et LAURENT : Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 778.

BERTHELOT. — Nouvelles recherches sur la fixation de l'azote atmosphérique par les Microbes, *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 563. — *Errata, id.*, p. 698.

BERTHELOT. — Observations sur la Communication de SCHLÆSING fils et LAURENT : Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 737.

BERTHELOT. — Recherches nouvelles sur les microorganismes fixateurs d'azote, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 842. — Id., *Ann. Ch. et Ph.*, 6^e s., t. XXX, 1893, p. 419.

BERTHELOT. — Observations sur la Note de WINOGRADSKY : Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les Microbes, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 1388.

BERTHELOT. — Sur l'absorption électrique de l'azote par les composés carbonés, *C. R.*, t. CXXIV, 1897, p. 528.

BERTHELOT et ANDRÉ. — Sur les matières azotées contenues dans l'eau de pluie, *C. R.*, t. CII, 1886, p. 957.

BERTHELOT et ANDRÉ. — Faits pour servir à l'histoire des principes azotés renfermés dans la terre végétale, *C. R.*, t. CXII, 1891, p. 189.

BEYERINCK. — Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen, *Bot. Zeit.*, t. XLVI, 1888, p. 725, 758.

BEYERINCK. — Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicola*. Ernährungsbedingungen dieser Bakterie, *Bot. Zeit.*, t. XLVIII, 1890, p. 838.

BEYERINCK. — Over ophooping van atmosferische Stickstoff in culturen van *Bacillus radicola*, *Akad. van Wetensch. te Amsterdam*, 1891.

BEYERINCK. — Ueber die Natur der Fäden der Papilionaceen-Knöllchen, *Centralbl. f. Bakt.*, 1 Abt., t. XV, 1894, p. 728, 732.

BEYERINCK. — Ueber oligonitrophile Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 561.

BEYERINCK et VAN DELDEN. — Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 3.

BIVONA. — *Pugill. plant. rar. Siculae*, t. IV, p. 26; t. VI, fig. 1, 2.

BÖHME. — Untersuchung über die Stickstoffernährung der Leguminosen, *Inaug. Diss.*, Leipzig, 1892.

BOKORNY. — Studien und Experim. über den chemischen Vorgänge der Assimilation, *Habilitationschr.*, Erlangen, 1888.

BONNEMA. — Gibt es Bakterien, die den freien N assimiliren oder ist dies ein chemischer Process? *Chem. Zeit.*, t. XXVII, 1903, p. 148.

BOUILHAC. — Sur la fixation de l'azote atmosphérique par l'association des Algues et des Bactéries, *C. R.*, t. CXXIII, 1897, p. 823.

BOUILHAC et GIUSTINIANI. — Sur une culture de Sarrasin en présence d'un mélange d'Algues et de Bactéries, *C. R.*, t. CXXXVII, 1903, p. 1275.

BOUSSINGAULT. — Recherches chimiques sur les végétations, *Ann. Ch. et Ph.*, 2^e s., t. LXVII, 1838, p. 5.

BOUSSINGAULT. — Recherches chimiques sur les végétations (2^e mémoire), *Ann. Ch. et Ph.*, 2^e s., t. LXIX, 1838, p. 353.

BOUSSINGAULT. — Remarques sur le Mémoire de G. VILLE : Sur l'absorption de l'azote et de l'air par les plantes, *C. R.*, t. XXXVIII, 1854, p. 717.

BOUSSINGAULT. — Expériences destinées à faire voir si l'azote de l'air en mouvement est fixé par les plantes, *C. R.*, t. XXXIX, 1854, p. 1 et 601.

BOUSSINGAULT. — Recherches sur la végétation, *Ann. Ch. et Ph.*, 3^e s., t. XLI, 1854, p. 5 et t. XLIII, 1855, p. 149.

BOUSSINGAULT. — Agronomie, Chimie agricole et Physiologie, t. I, 1858, p. 340; t. II, 1860, p. 1.

BOUSSINGAULT. — Lettre à GILBERT, 19 mai 1876. — Citée dans *Ann. Sc. agr.*, 2^e s., VI, 1900, t. II, p. 217.

BRÉAL. — Observations sur la fixation de l'azote atmosphérique par les Légumineuses dont les racines portent des nodosités, *C. R.*, t. CVII, 1888, p. 397.

BRÉAL. — Observations sur les tubercules à Bactéries qui se développent sur les racines des Légumineuses, *Ann. agr.*, t. XIV, 1888, p. 481.

BRÉAL. — Fixation de l'azote par les Légumineuses, *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 670.

- BRÉAL. — Expériences sur la culture des Légumineuses, *Ann. agr.*, t. XV, 1889, p. 529.
- BRÉAL. — Fixation de l'azote gazeux pendant la végétation, *Ann. agr.*, t. XVIII, 1892, p. 369.
- BREFELD. — Versuche über die Stickstoffaufnahme bei den Pflanzen, *Jahresb. d. Schl. Ges. f. vaterl. Cultur*, 15 nov. 1900.
- BRETSCHNEIDER. — Bemerkungen, *Landw. Jahrb.*, 1875, p. 393.
- BRUNCHORST. — Ueber die Knöllchen an den Wurzeln von *Alnus* und *Eleagnaceen*, 58 *Versamml. Naturf. und Ärzte; Bot. Centralbl.*, t. XXIV, 1885, p. 222.
- BRUNCHORST. — Ueber die Knöllchen an den Leguminosenwurzeln, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. III, 1885, p. 241.
- BRUNCHORST. — Ueber die Wurzelanschwellungen von *Alnus* und der *Eleagnaceen*, *Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen*, II, 1, 1886, p. 162, 174.
- BRUNCHORST. — Die Structur der Inaltskörper in den Zellen einiger Wurzelanschwellungen, *Bergen's Museum Aarsberet.*, 1886, p. 233.
- BUCHNER. — Notiz, betreffend das Vorkommen von Bakterien in normalen Pflanzengewebe, *Sitz. Ges. f. Morph. und Physiol., München*, t. IV, 1889, p. 127.
- BUHLERT. — Untersuchungen über die Arteinheit der Knöllchenbakterien der Leguminosen und über die landwirtschaftliche Bedeutung dieser Frage, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 148, 226 et 273.
- BUHLERT. — Ein weiterer Beitrag zur Frage der Arteinheit der Knöllchenbakterien der Leguminosen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 892.
- CANDOLLE (A.-P. de). — *Prodromus*, t. II, 1825, p. 93 et suiv.
- CANDOLLE (A.-P. de). — Mémoire sur les Légumineuses, 1825.
- CARON. — Landwirtschaftlich-bakteriologische Probleme, *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1895, p. 401.
- CAYARA. — I tubercoli radicali delle Leguminose, *Italia agricola*, 1898.
- CHARPENTIER. — Alimentation azotée d'une Algue, le *Cystococcus humicola*, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, 1903, p. 321.
- CHESTER. — Oligonitrophile Bodenbakterien, *Deleware Agric. Exper. Stat.*, résumé dans *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 382.
- CHEVREUL. — Rapport sur le mémoire de G. VILLE, *C. R.*, t. XLI, 1855, p. 757.
- CHEVREUL. — Sur le rôle de l'azote atmosphérique dans l'économie végétale, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 1460.
- CHODAT. — Parasitisme et symbiose, *Actes Congr. int. Bot.*, Paris, 1900, p. 23.
- CLOS. — Ébauche de la rhizotaxie, 1848.
- CLOS. — Du collet dans les plantes et de la nature de quelques tubercules, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 3^e s., t. XIII, 1850, p. 5.
- CLOS. — Revision des tubercules des plantes et des tuberculoïdes des Légumineuses, *C. R.*, t. CXXIII, 1896, p. 407. — *Id.*, *Mém. Acad. Sc. Toulouse*, 9^e s., t. V, 1893.
- CLOS. — Les tuberculoïdes des Légumineuses, d'après Ch. NAUDIN, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XLVI, 1899, p. 396.
- COHN. — Die neueren Forschungen betreffs der Assimilirung freien Stickstoffs, *Fähling's landw. Zeit.*, 1887.

- COHN. — Zur Geschichte der Leguminosen-Knöllchen, *Centralbl. f. Bakt.*, 1 Abt., t. X, 1891, 2, p. 190.
- CORNU. — Commission du Phylloxera, 17 janv. 1876.
- CORNU. — Études sur le *Phylloxera vastatrix*, *Mém. Acad. Sc.*, 2^e s., t. XXVI, 1878, p. 1.
- DALÉCHAMP. — *Historia generalis plantarum*, t. I, lib. III, cap. XLIV, p. 463, Lugdun., 1587. — Id., trad. J. DES MOULINS, t. I, chap. XLIV, p. 389, Lyon, 1615.
- DAWSON (Maria). — Nitragin and the nodules of Leguminous plants, *Proceed. Roy. Soc.*, 8 déc. 1898.
- DAY. — Ueber die Nichtassimilierung des atmosphärischen Stickstoffs durch keimende Gärste, *Transact. of Bot. Soc. Edinburg*, 1893.
- DEHÉRAIN. — Sur l'intervention de l'azote atmosphérique dans la végétation, *C. R.*, t. LXXXIII, 1871, p. 1352; t. LXXXVI, 1873, p. 1390.
- DEHÉRAIN. — Observations sur le Mémoire de BRETSCHNEIDER, *Ann. agr.*, t. II, 1876, p. 630.
- DEHÉRAIN. — Des pertes et des gains d'azote que subit la terre arable sous l'influence de diverses cultures, *Ann. agr.*, t. VIII, 1882, p. 321.
- DEHÉRAIN. — Sur les pertes et les gains d'azote des terres arables, *C. R.*, t. XCVI, 1883, p. 198.
- DEHÉRAIN. — Sur l'enrichissement du sol maintenu en prairie, *C. R.*, t. CI, 1885, p. 1273.
- DEHÉRAIN. — Sur la formation des nitrates dans les champs, *Ann. agr.*, t. XIII, 1887, p. 241.
- DEHÉRAIN. — L'ensemencement des ferments du sol, *Ann. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 174.
- DEHÉRAIN et DEMOUSSY. — Culture des Lupins blancs, *C. R.*, t. CXXX, 1900, p. 20.
- DEHÉRAIN et DEMOUSSY. — Sur la culture des Lupins bleus, *C. R.*, t. CXXX, 1900, p. 465.
- DEHÉRAIN et DEMOUSSY. — Culture des Lupins, *Ann. agr.*, t. XXVI, 1900, p. 57.
- DEHÉRAIN et MAQUENNE. — Sur la réduction des nitrates dans les terres arables, *Ann. agr.*, t. IX, 1883, p. 6.
- DELPINO. — Osservazioni sopra batteriocecidii e la sorgente d'azoto in una pianta di *Galega officinalis*, *Malpighia*, t. II, 1889, fasc. 9-10.
- DIETRICH. — Versuche über die Impfung mit Nitragin, *Jahresb. Versuchsst. Marburg*, 1896-97, p. 1.
- DIETRICH. — Bodenimpfversuche, *Deut. landw. Presse*, 1897, p. 125.
- DIETZELL. — Vegetationsversuche über die Frage, ob die Klee- und Erbsenpflanzen durch ihre oberirdischen Organe gebundenen Stickstoff aus Atmosphäre aufnehmen, *Bot. Centralbl.*, t. XX, 1884, p. 157.
- DIEULAFAIT. — Origine de l'acide azotique qui existe souvent dans le bioxyde de manganèse, *C. R.*, t. XCVI, 1883, p. 125.
- DOODY. — Cité par VUILLEMIN, *Ann. Sc. agr.*, 1888, 1, p. 121.
- DUCLAUX. — Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes, *C. R.*, t. C, 1885, p. 66.
- DUCLAUX. — Observations relatives à la Note de SCHLÖSING fils et LAURENT : Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 735.

DUMONT. — Sur le rôle de l'azote dans la végétation, *C. R.*, t. CVII, 1888, p. 315.

EDLER. — Wirkung von Nitragin und Impferde auf Lupinen, *Deuts. landw. Presse*, 1899, p. 1.

ERIKSSON. — Studier öfver Leguminosernas rotnölar, *Doctordiss. Lund*, 1874. Résumé dans *Bot. Zeit.*, t. XXXII, 1874, p. 382.

FERMI. — Stickstofffreie Mikroorganismen und Enzyme, *Centralbl. f. Bakt.*, 2. Abt., t. II, 1896, p. 505.

FRANK (A.). — Die Nutzbarmachung des freien Stickstoffes der Luft für Landwirtschaft und Industrie, *Chem. Zeit.*, t. XXVII, 1903, p. 542.

FRANK (A.-B.). — Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen, *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

FRANK (A.-B.). — Ueber das Wurzelälchen und die durch dasselbe verursachten Beschädigungen der Pflanzen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. II, 1884, p. 145.

FRANK (A.-B.). — Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch interirdischer Pilze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. III, 1885, p. 128.

FRANK (A.-B.). — Sind die Wurzelanschwellungen der Erlen und Elaeagnaceen Pilz-gallen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. V, 1885, p. 50.

FRANK (A.-B.). — Ueber die Quellen der Stickstoffnahrung der Pflanzen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. IV, 1886, p. 293.

FRANK (A.-B.). — La statistique de l'azote en agriculture, *Ann. Sc. agr.*, 1888, II, p. 24.

FRANK (A.-B.). — Ueber der Einfluss welchen das Sterilisiren des Erdbodens auf die Pflanzenentwicklung ausübt, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VI, 1888, p. LXXXVII.

FRANK (A.-B.). — Untersuchungen über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff und über den Kreislauf desselben in der Landwirtschaft, *Landw. Jahrb.*, t. XVII, 1888, p. 421. Trad. dans *Ann. agr.*, t. XV, 1889, p. 94.

FRANK (A.-B.). — Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffes durch erdbodenbewohnende Algen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 34.

FRANK (A. B.). — Ueber die gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse der Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 234.

FRANK (A.-B.). — Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 322.

FRANK (A.-B.). — Ueber Assimilation von Stickstoff an der Luft durch *Robinia pseudo-Acacia*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VIII, 1890, p. 292.

FRANK (A.-B.). — Inwieweit ist der freie Luftstickstoff für die Ernährung der Pflanzen verwertbar? — *Deutsche landw. Presse*, 1891, p. 779.

FRANK (A.-B.). — Ueber die auf Verdauung von Pilzen abzielende Symbiose der mit endotrophen Mykorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen. — *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. IX, 1891, p. 214.

FRANK (A.-B.). — Die Assimilation freien Stickstoffes bei den Pflanzen in ihrer Abhängigkeit von Species, von Ernährungsverhältnisse und von Bodenarten, *Land. Jarhb.*, t. XXI, 1892, p. 3.

FRANK (A.-B.). — Ueber die auf den Gasaustausch bezüglichen Einrichtungen und Thätigkeiten der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. X, 1892, p. 271.

FRANK (A.-B.). — Ueber MÖLLER's Bemerkungen bezüglich der dimorphen Wurzelknöllchen der Erbse. — *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. X, 1892, p. 390.

FRANK (A.-B.). — Die Assimilation des freien Stickstoffs durch die Pflanzenwelt. — *Bot. Zeit.*, t. LI, 1893, p. 139.

FRANK (A.-B.). — Ueber Bodenimpfung mit Stickstoffsammelnden Bakterien. — *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 778. — *Id.*, *Jahrb. d. d. landw. Gesell.*, t. XIII, 1898.

FRANK (A.-B.). — Die bisher erzielten Ergebnisse der Nitraginimpfung. — *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 441.

FRANK et OTTO. — Untersuchungen über Stickstoffassimilation in der Pflanze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VIII, 1890, p. 331.

FRANK et OTTO. — Ueber einige neue Versuche betreffs der Stickstoffassimilation in der Pflanze, *Deutsche landw. Presse*, t. XIII, 1891, p. 41.

FREUDENREICH (VON). — Ueber Stickstoffbindende Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. X, 1903, p. 514.

FRIES. — *Systema mycologicum*, t. II, 1825, p. 250.

FRUWIRTH. — Neue Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, t. XVIII, 1892, p. 18 et 127.

FRUWIRTH. — Dreijährigen Impfversuche mit Lupinen, *Deutsche landw. Presse*, t. XIX, 1893, p. 6.

FRUWIRTH. — Impfversuche mit Serradella und mit einblütiger Erve, *Deutsche landw. Presse*, t. XIX, 1893, p. 172.

FRUWIRTH. — Zur Frage der Bodenimpfung mit Nitragin, *Deutsche landw. Presse*, 1897, p. 94.

GAIN. — Influence des microbes du sol sur la végétation, *Rev. gén. Bot.*, t. XI, 1899, p. 18.

GASPARRINI. — Osservazioni sulla struttura dei tubercoli spongiosi di alcune piante leguminose, *Lette all' Acad. di Napoli*, 1851.

GATELLIER. — Sur l'absorption de l'azote de l'air par les Légumineuses, *BARRAL, Jnal de l'Agric.*, t. II, 1878, p. 342.

GAUTIER (A.) et DROUIN. — Recherches sur la fixation de l'azote par le sol et les végétaux, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 754, 863, 944, 1098, 1232 et 1605.

GAUTIER (A.) et DROUIN. — Sur la fixation de l'azote par le sol arable, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 820. — *Errata. Id.*, t. CXIII, p. 1082.

GAUTIER (A.) et DROUIN. — Remarques sur le mécanisme de la fixation de l'azote par le sol et les végétaux, *C. R.*, t. CXIV, 1892, p. 19.

GERLACH et VOGEL. — Stickstoffansammelnde Bakterien. — *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VIII, 1901, p. 669.

GERLACH et VOGEL. — Weitere Versuche mit stickstoffbindende Bakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 817, 881; t. X, 1903, p. 636.

GILBERT. — De quelques questions intéressant la chimie agricole. Trad. du *Gardner's Chronicle* dans *An. agr.*, t. V, 1879, p. 618.

GÖNNERMANN. — Die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Landw. Jahrb.*, t. XXIII, 1894, p. 649.

- GOTTHEIL. — Botanische Bedeutung einiger Bodenbakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 540, 582, 627.
- GRANDEAU. — Cours d'agriculture de l'École forestière, Nancy, 1879, p. 446.
- GRETE. — (sans titre), *Ber. d. d. Chem. Ges.*, t. XII, 1879, p. 674.
- HARTIG. — Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen, 1852, p. 365.
- HARTIG. — Die pflanzlichen Wurzelparasiten, *Centralbl. f. Bakt.*, t. III, 1888, p. 19, 58, 91, 118.
- HARTING. — Recherches concernant l'assimilation de l'azote de l'air par les végétaux, *C. R.*, t. XLI, 1855, p. 942.
- HARTLEB. — Ueber Alinit und den *Bacillus Ellenbachensis* α, *Bot. Centralbl.*, t. LXXII, 1897, p. 229.
- HARTLEB. — Repräsentirt das Alinitbakterium eine selbständige Art? *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 706.
- HEINRICH. — Les lupins et les engrais de potasse, *Zweiter Ber., Landw. Versuchsst.*, 1894, p. 278.
- HEINZE. — Ueber die Beziehungen der sogenannten Alinitbakterien zu den *Bacillus megaterium* bzw. zu den *Heubacillus*, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VIII, 1901, p. 391, 417, 449, 513, 545, 609, 663.
- HELLRIEGEL. — Welche Stickstoffquellen stehen den Pflanzen zu Gebote, *Tagebl. d. 59 Versamml. d. Naturf. und Ärzte in Berlin*, 1886.
- HELLRIEGEL. — Ueber die Beziehungen zu der Stickstoffnahrung der Leguminosen, *Zeitschr. d. Ver. f. Rübenzucker Indust.*, 1886, p. 863.
- HELLRIEGEL. — Beziehungen der Bakterien zu der Stickstoffernährung der Leguminosen, *Forsch. Agrikulturphys.*, t. X, 1887, p. 63.
- HELLRIEGEL. — Bemerk zu den Aufsätze von FRANK : « Ueber den Einfluss welchen das Sterilisiren des Erdbodens... », *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 131.
- HELLRIEGEL. — Ueber Stickstoffnahrung landwirtschaftlicher Kulturgewächse, *Ber. auf d. int. Land- und Forst-Kongress*, Wien, 1890.
- HELLRIEGEL et WILFARTH. — Ueber Stickstoffaufnahme der Pflanzen, *Tagebl. d. 60 Versamml. d. Naturf. und Ärzte zu Wiesbaden*, 1887, p. 362.
- HELLRIEGEL et WILFARTH. — Erfolgt die Assimilation des freien Stickstoffs durch die Leguminosen unter Mitwirkung niederen Organismen? *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 138.
- HELLRIEGEL et WILFARTH. — Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen, *Beilageh. z. d. Zeitschr. des Vereins f. d. Rübenzuckerindust.*, 1888. Trad. dans *An. Sc. agr.*, 7^e an., t. I, 1890, p. 84 et 189.
- HENRY. — L'azote et la végétation forestière, *An. Sc. agr.*, 2^e s. 1897, t. II, p. 359. — *Id.*, *Soc. des Sc. de Nancy*, 1^{er} juin 1897.
- HERMANN. — Untersuchungen über die Fäulniss des Holzes, *Jnal f. prakt. Ch.*, t. XXVII, 1842, p. 165.
- HILTNER. — Ueber einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von *Alnus* und der Elaeagnaceen, *Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen*, 1886, II, 1.
- HILTNER. — Ueber die Bedeutung der Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* für die Stickstoffnahrung dieser Pflanze, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVI, 1899.

HILTNER. — Ueber die Assimilation des freien atmosphärischen Stickstoffs durch oberirdischen Pflanzenteilen lebende Mycelien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 831.

HILTNER. — Ueber die Ursachen, welche die Grösse, Zahl, Stellung und Wirkung der Wurzelknöllchen der Leguminosen bedingen, *Biol. Abt. f. Land. und Forstwirtsch.*, t. I, 1900, Bd II. — *Id.*, *Arb. a. d. biol. Abt. d. K. Ges. Amtes*, t. I, 1901, heft II.

HILTNER. — Ueber die Bakteroiden der Leguminosen-Knöllchen und ihre willkürliche Erzeugung ausserhalb der Wirtspflanzen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1900, p. 273.

HILTNER. — Ueber die Impfung der Leguminosen mit Reinkulturen, *Deutsche landw. Presse*, 1902, p. 119.

HILTNER. — Ueber die neue Ergebnisse auf den Gebiete der Bodenbakteriologie, *Ökon. Ges. in Königr. Sachsen*, 7 février 1902.

HILTNER. — Beiträge zur Mycorrhizafrage, *Naturw. Zeitschr. f. Land- und Forstwirts.*, t. I, 1903, p. 9.

HILTNER et STÖRMER. — Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger, *Arb. a. d. biol. Abt. d. k. Ges. Amtes*, t. III, 1903, p. 151, 307.

HÜNEFELD, REICHARDT et HERTZ. — Mittel zur Bildung der Salpetersäure im Boden, *Biederm. Centralbl.*, t. VIII, 1879, p. 327.

IMMENDORFF. — Beiträge zur Kenntniss der Stickstofffrage, *Landw. Jahrb.*, t. XXI, 1892, p. 281.

INGEN-HOUZ. — Expériences sur les végétaux, t. I, sect. XX, p. 86, Paris, 1787.

JACOBITZ. — Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffes, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 783, 833, 876.

JACOBITZ. — Ueber stickstoffsammelnde Bakterien und ihre Bedeutung für die Landwirtschaft, *Münch. med. Wochenschr.*, 1902, n° 36.

JACOBITZ. — Beitrag zur Frage der Stickstoffassimilation durch den *Bacillus Ellenbachensis* α Caron, *Zeitschr. f. Hyg. und Infekt.*, t. XLV, 1903, p. 96.

JANSE. — Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises, *An. Jard. Buitenzorg*, t. XIV, 1897, p. 67.

JESSEN. — Knollenbildung an Wurzeln, *Verhandl. Bot. Ver. d. Prov. Brandenburg*, t. XIX, 1877, p. 79.

JOULIE. — Fixation de l'azote atmosphérique dans le sol cultivé, *C. R.*, t. CI, 1885, p. 1008. — *Id.*, *An. agr.*, t. XII, 1886, p. 5.

KAYSER. — L'assimilation de l'azote au Congrès de Berlin en 1886, *An. agr.*, t. XII, 1886, p. 521.

KIONKA. — Die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Biol. Centralbl.*, t. XI, 1891, p. 282.

KIRCHNER. — Die Wurzelknöllchen der Sojabohne, *Beitr. z. Biol. d. Pfl.*, t. VII, 1895, p. 213.

KNY. — Wurzelanschwellungen von *Alnus glutinosa*, *Verhandl. Bot. Ver. d. Prov. Brandenb.*, t. XVIII, 1876, p. 2.

KNY. — Knollenbildung an den Wurzeln von *Pisum sativum*, *Verhandl. Bot. Ver. d. Prov. Brandenb.*, t. XIX, 1877, p. 79. — *Id.*, *Bot. Zeit.*, 1878, p. 708.

KNY. — Ueber die Wurzelanschwellungen der Leguminosen und ihre

Erzeugung durch Einfluss der Parasiten, *Sitzber. d. Bot. Ver. d. Prov. Brandenb.*, 1878.

KNY. — Zu dem Aufsatz des Herrn Prof. B. FRANK : « Ueber die Parasiten... », *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 537.

KOCH. — Zur Kenntniss der Fäden in den Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Bot. Zeit.*, t. XLVIII, 1890, p. 607.

KOCH et KOSSOWITSCH. — Ueber die Assimilation von freien Stickstoff durch Algen, *Bot. Zeit.*, t. LI, 1893, II, p. 321.

KOLACZEK. — Lehrbuch der Botanik, 1856.

KOLKWITZ. — Beiträge zur Kenntniss der Erdbakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 670.

KOSSOWICZ. — Die Herkunft des Stickstoffs in der Pflanzen, *Mitth. Land. Akad. zu Petrowsky*, t. XIII, 1890, p. 61.

KOSSOWITSCH. — Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf? *Bot. Zeit.*, t. L, 1892, p. 697, 713, 729, 745, 771.

KOSSOWITSCH. — Untersuchungen über die Frage ob die Algen freien Stickstoff fixiren, *Bot. Zeit.*, t. LII, 1894, p. 97.

KOWERSKI (VON). — Der weisse Senf als Stickstoffvermehrter des Bodens, *Inaug. Diss.*, Halle, 1895.

KRÜGER. — Beiträge zur Kenntniss niederer Organismen der Saftflusses der Laubbäume, *Zopf's Beitr.*, 1894, heft IV.

KRÜGER. — Die neuesten Forschungen der landwirtschaftlichen Bakteriologie, *Jahrb. d. D. Landw. Ges.*, t. XV, 1900.

KRÜGER et SCHNEIDEWIND. — Untersuchungen über Alinit, *Landw. Jahrb.*, t. XXVIII, 1899, p. 579.

KRÜGER et SCHNEIDEWIND. — Sind niedere chlorophyllgrüne Algen imstande, den freien Stickstoff der atmosphäre zu assimiliren und den Boden an Stickstoff zu bereichern, *Landw. Jahrb.*, t. XXIX, 1900, p. 771.

KRÜGER et SCHNEIDEWIND. — Zersetzen und Umsetzungen von Stickstoffverbindungen im Boden durch niedere Organismen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1900, p. 930.

KÜHN. — Wirkung des Nitragins bei den im landwirtschaftlichen Institut der Universität Halle ausgeführten Versuchen, *Zeitschr. f. die Landw. d. Prov. Sachsen*, 1896.

KÜHN. — Eine Wirkung des Nitragins, *Zeitschr. Landw. Kammer Prov. Sachsen*, 1897, p. 60.

KÜHN. — Die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bodenbakterien ohne Symbiose mit Leguminosen, *Fühling's Landw. Zeit.*, 1901.

KÜHN et RAUTENBERG. — Vegetationsversuche in Lösungen im Sommer 1863, *Landw. Versuchsst.*, t. VI, 1864.

LACHMANN. — Ueber Knollen an den Wurzeln der Leguminosen, *Landw. Mitth.*; *Zeitschr. d. Landw. Lehranst. zu Poppelsdorf*, t. I, 1858, p. 34.

LAUCK. — Welches sind die Bestandteile des als « Alinit » bezeichneten Impfdüngers für Saatgetreide...? *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 290.

LAUCK. — Wissenschaftliche und praktische Studien über.... Nitragin und Alinit, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 20, 54, 87.

LAURENT. — Recherches physiologiques sur les animalcules des infusions végétales comparées aux organes essentiels des végétaux. 1854.

LAURENT. — Recherches sur les Infusoires, *C. R.*, t. XXXIX, 1854, p. 1034.

LAURENT (E.). — Les microbes du sol, *Bull. Acad. r. Belg.*, 3^e s., t. II, 1886, p. 128.

LAURENT (E.). — Expériences sur la production des nodosités chez le Pois, *Bull. Acad. r. Belg.*, 3^e s., t. XIX, 1890, p. 764.

LAURENT (E.). — Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses, *An. Inst. Pasteur*, t. V, 1891, p. 105.

LAWES. — Études sur les prairies permanentes, *Jnal Roy. Agric. Soc. Engl.*, t. XXI, part. I; trad. dans *Ann. agr.*, t. XVI, 1896, p. 166.

LAWES et GILBERT. — Determinations of nitrogen in the soils of some of the experimental fields at Rothamsted, *Meet. Amer. Ass. f. Adv. of Sc.*, Montréal, 1882. Trad. dans *An. agr.*, t. IX, 1883, p. 393, 451.

LAWES et GILBERT. — On the present position of the question of the sources of the nitrogen of vegetation (Preliminary notice), *Proceed. Roy. Soc.*, t. XLIII, 1887. Trad. dans *An. agr.*, t. XIV, 1888, p. 78.

LAWES et GILBERT. — On the present position of the question of the sources of the nitrogen of vegetation (Full paper), *Phil. Trans.*, t. CLXXX, 1889.

LAWES et GILBERT. — Results of experiments at Rothamsted on the growth of leguminous crops for many years in succession on the same land, *Agric. Stud. Gaz.*, nouv. s., t. IV, 1889-90.

LAWES et GILBERT. — New experiments on the question of the fixation of free nitrogen (Preliminary notice), *Proceed. Roy. Soc.*, t. XLVII, 1890.

LAWES et GILBERT. — Results of experiments at Rothamsted on the question of the fixation of free nitrogen, *Agric. Stud. Gaz.*, nouv. s., t. V, 1890-91.

LAWES et GILBERT. — The sources of nitrogen of our leguminous crops, *Jnal Roy. Agric. Soc. Engl.*, 3^e s., t. III, 1891.

LAWES et GILBERT. — History and present position of the Rothamsted investigations, Londres, 1891.

LAWES et GILBERT. — Upon some properties of soils which have grown a cereal crop and a leguminous crop for many years in succession, *Agric. Stud. Gaz.*, nouv. s., t. VII, 1895.

LAWES et GILBERT. — The agricultural investigations at Rothamsted during a period of fifty years, *Dep. Agric. U. S.*, Washington, 1895, Bull. 22.

LAWES, GILBERT et PUGH. — On the sources of the nitrogen of vegetation, *Proceed. Roy. Soc.*, t. X, 1860, p. 544. — Id., *Phil. Trans.*, 1861, II, p. 431. — Id., *Jnal. Chem. Soc.*, new ser., t. I; ent. s., t. XVI, 1863.

LECOMTE. — Observations à VAN TIEGHEM et DOULIOT : « Origine .. des tubercules radicaux des Légumineuses », *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 109.

LEVY. — Beitrag zur Lehre von der Stickstoffaufnahme der Pflanzen, *Inaug. Diss.*, Halle, 1889.

LIEBSCHER. — Beitrag zur Stickstofffrage. — *Jnal f. Landw.*, t. XLI, 1893, p. 139.

LOEW. — Bildung von Salpetrigsäure und Ammoniak aus freiem Stickstoff, *Ber. d. d. Ch. Ges.*, t. XXIII, 1890, p. 1443.

LOHRER. — Beiträge zur anatomischen Systematik, *Inaug. Diss.*, Marburg, 1886.

LONAY. — La question de l'azote et la culture des Légumineuses, 1 vol. in-8, Nivelles, 1899.

LOTSY. — A contribution to the investigations of the assimilation of free atmospheric nitrogen by withe and black mustard, *Off. of. Exper. Stat.*, Bull. n° 18.

LUNDSTROM. — Pflanzenbiologische Studien; II, Die Anpassungen der Pflanzen und Thiere, *Nov. Act. Soc. Sc. Upsal.*, sér. III, t. XIII, 1877, f. 2.

LUNDSTROM. — Ueber Mykodomatien in den Wurzeln der Papilionaceen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXIII, 1888, p. 159.

LUTOSLAWSKI. — Zwei Versuche mit Alinit, *Deuts. landw. Presse*, t. XXV, 1898, p. 920.

MAGNUS. — Knospenbildung an Wurzeln, *Verhandl. Bot. Ver. d. Prov. Brandenburg*, t. XX, 26 avril 1878.

MALPEAUX. — Emploi de l'alinite dans la culture des céréales, *An. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 482.

MALPEAUX. — L'alinite dans la culture des céréales, *An. agr.*, t. XXVI, 1900, p. 196.

MALPEAUX. — Expériences sur la culture des Légumineuses, *An. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 65.

MALPEAUX. — Nouvelles recherches sur l'inoculation des sols avec l'alinite, *An. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 191.

MALPIGHI. — *Anatome plantarum; pars sec.; de Gallis, Opera*, I, 1687.

MAQUENNE. — L'azote atmosphérique et la végétation, *An. agr.*, t. XVII, 1891, p. 145.

MARCHAL. — Influence des sels minéraux sur la production des nodosités chez le Pois. — *C. R.*, t. CXXXIII, 1901, p. 1082.

MATTEI. — Ancora sull' origine della *Vicia Faba*, Bologne, in-8, 1887.

MATTIROLO. — I tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 420.

MATTIROLO. — Sulla influence che la estirpazione dei fiori esercita sui tubercoli radicali delle piante leguminose, *Malpighia*, t. XIII, 1899, p. 382.

MATTIROLO et BUSCALIONI. — Si contengono batteri nei tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 464.

MATTIROLO et BUSCALIONI. — Ancora sui Batteroidi delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 536.

MAXWELL. — Methoden und Lösungsmittel zur annähernden Feststellung der wahrscheinlich assimilierbaren Pflanzennährstoffe in Böden. *Landw. Versuchsst.*, 1898, p. 331.

MAYER. — Agriculturechemie.

MAZÉ. — La fixation de l'azote par le Bacille des Légumineuses, *An. Inst. Pasteur*, t. XI, 1897, p. 44.

MAZÉ. — Les microbes des nodosités des Légumineuses, *An. Inst. Pasteur*, t. XII, 1898, p. 1 et 128.

MAZÉ. — Évolution du carbone et de l'azote, 1 vol., 110 p., Paris, 1899.

MÈNE. — Expériences sur l'influence de l'azote dans la végétation, *C. R.*, t. XXXII, 1851, p. 180.

- MEYEN. — Abhandlung über das Herauswachsen parasitischer Gewächse aus den Wurzeln, *Flora*, t. XII, 1829, p. 49.
- MEYER. — Ueber *Plasmodiophora alni*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. III, 1885, p. 102.
- MEYER. — Beiträge zur Kenntniss der *Frankia subtilis*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. VII, 1889, p. 218.
- MEYER. — Bemerkungen zu FRANK's Mittheilungen über den Dimorphismus der Wurzelknöllchen der Erbse, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. X, 1892.
- MORCK. — Ueber die Formen der Bakteroiden bei den einzelnen Species der Leguminosen, *Inaug. Diss.*, Leipzig, 1891.
- MORREN. — Sur l'absorption de l'azote par les animalcules et par les Algues. — *C. R.*, t. XXXVIII, 1854, p. 932.
- MULDER. — Chemie of animals and vegetable physiology.
- MÜNTZ et AUBIN. — Sur les origines de l'azote combiné existant à la surface de la terre, *C. R.*, t. XCVII, 1883, p. 240.
- MÜNTZ et GIRARD. — Les engrais, Paris, 1887.
- NAUDIN (Ch.). — Nouvelles recherches sur les tubercules des Légumineuses, *C. R.*, t. CXXIII, 1896, p. 666.
- NAUDIN (Ch.). — Recherches sur les nodosités ou tubercules des Légumineuses, 1 br. in-12, 75 p., 1897.
- NAUDIN (Laurent). — Historique de la fixation de l'azote gazeux atmosphérique par le sol et les végétaux, *Monit. scient. Quesneville*, 4^e s., t. XVII, 1903, p. 225.
- NEUMANN. — Die Bakterien der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. LV, 1901, p. 187.
- NEUMANN. — Untersuchungen über das Vorkommen von Stickstoffassimilirenden Bakterien im Ackerboden, *Landw. Versuchsst.*, t. LVI, 1902, p. 203.
- NOBBE. — Ueber die Stickstoffernährung der Leguminosen, *Verh. Ges. Naturf. und Ärzte zu Bremen*, t. II, 1890, p. 551.
- NOBBE. — Opinion rapportée par WELCKER dans *Anal. Roy. Agric. Soc. England*, 1896, p. 253.
- NOBBE. — Ueber einige neuere Beobachtungen betreffend die Bodenimpfung mit reincultivirten Knöllchenbakterien für die Leguminosenkultur, *Chem. Zeit.*, t. XX, 1896, p. 785.
- NOBBE. — Bodenimpfung mit reincultivierten Knöllchenbakterien für die Kultur von Leguminosen, *Sitzungsber. d. naturw. Ges. Isis*, 1897.
- NOBBE. — Ueber die Wirkung der Leguminosen-Knöllchen in der Waserkultur, *Landw. Versuchsst.*, t. LII, 1899, p. 455.
- NOBBE et HILTNER. — Ueber die Verarbeitungsfähigkeit der Leguminosenbakterien, *Landw. Versuchsst.*, t. XLIII, 1892.
- NOBBE et HILTNER. — Wodurch werden die Knöllchen besitzenden Leguminosen befähigt, der freien atmosphärischen Stickstoff für sich zu verwerthen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLIV, 1893, p. 459.
- NOBBE et HILTNER. — Eine aus der ungleichen Wirkungskraft der Knöllchenbakterien sich ergebende praktische Schlussfolgerung, *Magdeb. Zeit.*, 1894, p. 68.
- NOBBE et HILTNER. — Vermögen auch Nichtleguminosen freien Stickstoff aufzunehmen? *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1894, p. 155.

NOBBE et HILTNER. — Ueber die Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien ungleichen Ursprungs an verschiedene Leguminosen Gattungen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVII, 1896, p. 377.

NOBBE et HILTNER. — Sur l'action de la nitragine dans les champs, *Deutsche landw. Presse*, 1898, p. 3. — Anal. par DEHÉRAIN, *An. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 183.

NOBBE et HILTNER. — Ueber die Dauer der Anpassungsfähigkeit der Knöllchenbakterien an bestimmte Leguminosen Gattungen, *Landw. Versuchsst.*, t. XLIX, 1898, p. 467, 481.

NOBBE et HILTNER. — Die endotrophe Mykorrhiza von *Podocarpus* und ihre physiologische Bedeutung, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 160.

NOBBE et HILTNER. — Wie lässt sich der Wirkung des Nitragins erhöhen? *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 447.

NOBBE et HILTNER. — Ueber die Wirkung der Leguminosenknöllchen in der Wasserkultur, *Landw. Versuchsst.*, t. LII, 1899, p. 455.

NOBBE et HILTNER. — Künstliche Ueberführung der Knöllchenbakterien von Erbsen in solche von Bohnen, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VI, 1900, p. 449.

NOBBE et HILTNER. — Ueber den Einfluss verschiedener Impfstoffmengen auf die Knöllchenbildung und der Ertrag der Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. LV, 1901, p. 141.

NOBBE, HILTNER et SCHMID. — Versuche über die Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen, insbesondere über die Frage der Arteinheit derselben, *Landw. Versuchsst.*, t. XLV, 1895, p. 1.

NOBBE et RICHTER. — Ueber den Einfluss der Nitratstickstoffes und der Humussubstanzen auf den Impferfolg bei Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. LVI, 1902, p. 441.

NOBBE, SCHMIDT, HILTNER, HOTTER. — Versuche über die Stickstoffassimilation der Leguminosen, *Landw. Versuchsst.*, t. XXXIX, 1891.

NOBBE, SCHMIDT, HILTNER, HOTTER. — Ueber die Verbeitungsfähigkeit der Leguminosenbakterien in Boden, *Landw. Versuchsst.*, t. XLI, 1892, p. 137.

OTTO. — Die Assimilation des freien Stickstoffes durch die Pflanze, *Bot. Centralbl.*, t. XLVII, 1891.

PAGEL. — Mooreultur, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, suppl., p. 351.

PAGNOUL. — Expériences relatives aux pertes ou aux gains d'azote éprouvés par une terre nue ou cultivée, *C. R.*, t. CX, 1890, p. 910. — Id., *An. agr.*, t. XVI, 1890, p. 250.

PARATONE. — Ricerche istologiche sui tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. XIII, 1899, p. 211.

PARATONE. — Sul polimorfismo del *Bacillus radicolica*, *Malpighia*, t. XV, 1902, p. 175.

PARATONE. — Ricerche su la struttura e le alterazioni del nucleo nei tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. XV, 1902, p. 178.

PASSERINI. — Sui tubercoli radicali della *Medicago sativa*, *Boll. Soc. bot. it., Firenze*, 1900, p. 16.

PASTEUR. — Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère (chap. IX, p. 106), *An. Ch. et Ph.*, 3^e s., t. LXIV, 1862, p. 5 et suiv.

- PASTEUR. — Observations relatives à la Note de DUCLAUX : « Germination dans un sol riche... », *C. R.*, t. C, 1885, p. 68.
- PETERMANN. — Contribution à la question de l'azote, *Bull. Acad. r. Belg.*, 3^e s., t. XVIII, 1888, p. 632, 634; t. XX, 1890, p. 431; t. XXIII, 1893, p. 267.
- PETERMANN. — Recherches de chimie et de physiologie appliquées à l'Agriculture, t. II, 1894, p. 207, 229, 265.
- PFEIFFER et FRANK. — Beitrag zur Frage der Ververtung elementaren Stickstoff durch den Senf, *Landw. Versuchsst.*, t. XLVI, 1896, p. 117, 151. — Id., t. XLVIII, 1897, p. 455.
- PICHARD. — Action nitrifiante comparée de quelques sels contenus naturellement ou ajoutés dans les terres végétales, *C. R.*, t. XCVIII, 1884, p. 1289.
- PICHARD. — Influence, dans les terres nues, du plâtre et de l'argile sur la conservation de l'azote, la fixation de l'azote atmosphérique et la nitrification. — *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 445.
- PICHARD. — Influence, dans les terres nues, des proportions d'argile et d'azote organique sur la fixation de l'azote atmosphérique, sur la conservation de l'azote et sur la nitrification, *C. R.*, t. CXIV, 1892, p. 81.
- PICHI. — Alcune osservazioni sui tubercoli radicali delle Leguminose, *Atti della Soc. Tosc. di Sc. nat.*, t. VI, 1888, p. 45.
- PIROTTA. — I tubercoli radicali delle Leguminose, *Malpighia*, t. I, 1887, p. 290.
- PIROTTA. — Alcune osservazioni nei tubercoli radicali delle Leguminose, *Atti della Soc. Tosc. di Sc. nat.*, t. VI, 1888, p. 45.
- PIROTTA. — Per la storia dei batteroidi delle Leguminose, *Malpighia*, t. II, 1888, p. 156.
- PLINIUS. — *Naturalis historiæ*, Lib. XVIII, § xxxvi, 2.
- POITEAU. — Note sur l'*Arachis hypogea*, *An. Sc. nat. Bot.*, 3^e s., t. XIX, 1853, p. 268.
- PRANTL. — Die Assimilation freien Stickstoffs und der Parasitismus des *Nostoc*, *Hedwigia*, t. XXVIII, 1889, n^o 2.
- PRAZMOWSKI. — Ueber die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXVI, 1888, p. 215, 248, 280.
- PRAZMOWSKI. — Sur les tubercules des racines de Légumineuses, *Congr. nat. Polon.*, 20 juillet 1888; résumé dans *An. agr.*, t. XV, 1889, p. 137.
- PRAZMOWSKI. — Die Wurzelknöllchen der Erbse, *Landw. Versuchsst.*, t. XXXVII, 1890, p. 161.
- PRAZMOWSKI. — Die Wurzelanschwellungen der Leguminosen, *Krakau*, 1890.
- PRIESTLEY. — Expériences sur l'air, t. IV, 5^e p., sect. XXXII, p. 371, 1780.
- PRILLIEUX. — Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercules qui naissent sur les racines des Légumineuses, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXVI, 1879, p. 98.
- PRILLIEUX. — Observations à la communication de VAN TIEGHEM et DOULIOT : « Sur... les tubercules des racines de Légumineuses », *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXV, 1888, p. 108.
- PRILLIEUX. — Anciennes observations sur les tubercules des racines de

Légumineuses, *C. R.*, t. CXI, 1890, p. 926. — *Id.*, *Bull. Soc. bot. Fr.*, t. XXXVII, 1890, p. 285.

PROVE. — Untersuchungen über den Stickstoffnahrung der Erbsen, *Zeitschr. d. landw. Ver. in Bayern*, 1892, p. 85.

PROVE. — Untersuchungen über den Stickstoffgehalt der Böden nach dem Anbau verschiedener landwirtschaftlicher Kulturgewächse, *Zeitschr. d. landw. Ver. in Bayern*, 1893, p. 59 et 101.

PRURIEWITSCH. — Ueber die Stickstoffassimilation bei den Schimmelpilze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. XIII, 1895, p. 342.

REICHARDT. — *Nachrichten aus dem Club der Landw. zu Berlin*, 1878, p. 460.

REINKE. — Untersuchungen über die Assimilationsorgane der Leguminosen, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXX, 1894-95, p. 1.

REMY. — Bodenbakteriologische Studien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VIII, 1901, p. 657, 699, 728, 761.

RICHTER. — Zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen, *Landw. Versuchsst.*, t. LI, 1899, p. 221.

RONNA. — Rothamsted, 1/2 siècle d'expériences agronomiques de MM. LAWES et GILBERT. Liv. X, l'azote atmosphérique, *An. Sc. Agr.*, 2^e s., t. VI, vol. 2, 1900, p. 208.

SAIDA. — Ueber die Assimilation freien Stickstoffs durch Schimmelpilze, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. XIX, 1901, p. (107).

SALFELD. — Ueber die Verwertung der HELLRIEGEL'schen Versuche mit Leguminosen in landwirtschaftlichen Betrieb, *Biedermann's Centralbl.*, t. XVIII, 1889, p. 239.

SALFELD. — Düngungsversuche in der Provinz Hannover, *Biederm. Centralbl.*, t. XVIII, 1889, p. 514.

SALFELD. — Vernichtung der Leguminosenpilze durch Ätzkalk, *Deutsche landw. Presse*, t. XXI, 1894, p. 785.

SALFELD. — Samenimpfversuche mit Nitragin bei Serradella, *Deut. landw. Presse*, t. XXIV, 1897, p. 809.

SALFELD. — Einiges über die Leguminosen in der Fruchtfolge, *Deutsche landw. Presse*, t. XXVI, 1899, p. 259.

SALFELD. — Welche Wirkung hat Ätzkalk in hohem leichtem Sandboden auf Leguminosenpilz? *Deuts. landw. Presse*, t. XXVII, 1900, p. 931.

SALFELD. — Vernichtet Ätzkalk die Leguminosenpilz auf hohem, leichtem Sandboden? *Hannov. land- und forstw. Zeit.*, t. LIII, 1901, n° 39.

SAUSSURE (DE). — *Recherches chimiques sur la végétation*, 1 vol., 1804, p. 206.

SCHENK. — Opinion verbale citée par FRANK : « Ueber die Parasiten... », *Bot. Zeit.*, t. XXXVII, 1879, p. 377.

SCHINDLER. — Zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Papilionacen, *Bot. Centralbl.*, t. XVIII, 1884, p. 84.

SCHINDLER. — Ueber die biologische Bedeutung der sog. Wurzelknöllchen bei den Papilionaceen, *Jnal f. Landw.*, t. XXXIII, 1885, p. 325.

SCHLÆSING. — Sur la fixation de l'azote atmosphérique par la terre végétale, *C. R.*, t. LXXXII, 1876, p. 1202.

SCHLÆSING. — Sur les relations de l'azote atmosphérique avec la terre végétale, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 805, 898, 982.

SCHLÆSING. — Sur les relations de l'azote atmosphérique avec la terre végétale. — Réponse aux observations de M. BERTHELOT, *C. R.*, t. CVI, 1888, p. 1123.

SCHLÆSING. — Sur les relations de l'azote atmosphérique avec la terre végétale, *C. R.*, t. CVII, 1888, p. 654; t. CIX, 1889, p. 210.

SCHLÆSING. — Sur les relations de l'azote atmosphérique avec la terre végétale. — Réponse à M. BERTHELOT, *C. R.*, t. CIX, 1889, p. 345.

SCHLÆSING. — Observations sur la communication de M. BERTHELOT : Nouvelles recherches sur la fixation de l'azote par les microbes (Avec réponse de BERTHELOT), *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 636.

SCHLÆSING fils et LAURENT. — Sur la fixation de l'azote gazeux par les Légumineuses, *C. R.*, t. CXI, 1890, p. 750 (Avec observation de BERTHELOT).

SCHLÆSING fils et LAURENT. — Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 766 (Avec observation de BERTHELOT).

SCHLÆSING fils et LAURENT. — Observations sur la note de A. GAUTIER et DROUIN : Sur la fixation de l'azote par le sol arable, *C. R.*, t. CXIII, 1891, p. 1059.

SCHLÆSING fils et LAURENT. — Sur la fixation de l'azote libre par les plantes, *C. R.*, t. CXV, 1892, p. 659 et 732.

SCHMITTER. — Die Impfung des Lehmsbodens zu Lupinen mit bakterienreicher Erde, *Inaug. Diss.*, Heidelberg, 1894. — Id., *Bot. Centralbl.*, t. LVII, 1894, p. 25.

SCHNEIDER (A.). — Beitrag zur Kenntniss der Rhizobien, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. XII, 1894, p. 11.

SCHNEIDER (A.). — Mutualistic symbiosis at Algæ and Bacteria with *Cycas revoluta*, *Bot. Gaz.*, 1894, p. 25.

SCHNEIDER. — Essais d'inoculation des Bactéries des Légumineuses aux Graminées, *Illinois Station Bull.*, 1894, p. 301.

SCHRIBAUX. — *Agriculture pratique*, t. I, 1897, p. 813.

SCHULTZ. — Reinerträge auf leichtem Boden. — *Landw. Jahrb.*, 1881, p. 771-848.

SCHULTZ. — Das Wirtschaftssystem in Lupitz, *Jnal f. Landw.*, t. XXXI, 1883.

SCHULTZ. — Opinion verbale rapportée par SCHULZE, *Jnal f. Landw.*, t. XXXIII, 1885.

SCHULZE. — Versuche mit der Impfung der Leguminosenkörner mittels Nitragin, *Jahrb. Versuchsst. Breslau*, 1896, p. 13.

SCHULZE. — Beiträge zur Alinitfrage, *Landw. Jahrb.*, t. XXX, 1901, p. 319, 360.

SCHULZE. — Düngungsversuche mit Alinit zu Hafer, *Biederm. Centralbl.*, t. XXX, 1901, p. 421.

SCHULZE. — Seradella und Kalk, *D. landw. Presse*, t. XXIX, 1902, p. 882.

SEWERIN. — Ein Beitrag zur Alinitfrage, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 712, 746.

SHIBATA. — Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen, *Pringsh. Jahrb.*, t. XXXVII, 1901-1902, p. 643.

SIMON. — Zusammensetzung der natürlichen Humusäure. — *Landw. Versuchsst.*, t. XVIII, 1875, p. 452.

- SMITH (Greig). — The nodule organism of Leguminose, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VI, 1900, p. 371.
- SORAUER. — Pflanzenkrankheiten, 2 Aufl., Berlin, 1886, p. 743.
- SORAUER. — Zusammenstellung der neuen Arbeiten über die Wurzelknöllchen und deren als Bakterien angesprochene Inhalts-Körperchen, *Bot. Centralbl.*, t. XXXI, 1887, p. 308 et 343.
- STAHL. — Der Sinn der Mykorrhizenbildung, *Pringsh. Jahrb.*, t. XXXIV, 1899-1900, p. 539. Trad. dans *An. agr.*, t. XXVII, 1901, p. 113.
- STOKLASA. — Studien über die Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanzen, *Landw. Jahrb.*, t. XXIV, 1895, p. 827-863.
- STOKLASA. — Was ist Alinit? *Chem. Zeit.*, t. XXII, 1898, p. 181.
- STOKLASA. — Biologische Studie über Alinit, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 39, 78, 119, 284, 507, 535.
- STOKLASA. — Nouvelles recherches biologiques sur le *Bacillus megaterium*. Alinite, Lettre à DEHÉRAIN, *An. agr.*, t. XXIV, 1898, p. 253.
- STOKLASA. — Die gegenwärtige Stand der Nitraginfrage, *Zeitschr. f. landw. Versuchswesen in Oesterr.*, t. I, 1898.
- STOKLASA. — Assimilieren die Alinitbakterien den Luftstickstoff? *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. V, 1899, p. 350; t. VI, 1900, p. 22.
- STOKLASA. — Ueber neue Probleme der Bodenimpfung, *Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Oesterr.*, t. III, 1900, p. 440. — Id., *D. landw. Presse*, t. XXVII, 1900, n° 17.
- STOKLASA. — Replik auf J. BEHREN's Bemerkungen im Referate « Ueber neue Probleme der Bodenimpfung », *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 22.
- STOKLASA et SEMPOLOWSKI. — Versuche mit Nitragin und Alinit, *D. landw. Presse*, t. XXVI, 1899, p. 13.
- STOKLASA et VITEK. — Die Stickstoffassimilation durch die lebende Bakterienzelle, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 257.
- STRECKER. — Ueber die Bereicherung des Bodens durch den Anbau bereichernder Pflanzen, *Jnal f. Landw.*, t. XXXIV, 1886, p. 1.
- STUTZER. — Neuere Arbeiten über die Knöllchenbakterien der Leguminosen und die Fixierung des freien Stickstoffs durch die Thätigkeit von Mikroorganismen, *Centralbl. f. Bakt.*, t. I, 1895, p. 68; t. II, 1896, p. 650.
- STUTZER. — Beiträge zur Morphologie der als *Bacillus radicola* beschriebenen Organismen, *Mitth. landw. Inst. Univ. Breslau*, 1900, heft III.
- STUTZER. — Die Bildung von Bakteroiden in künstlichen Nährboden, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. VII, 1901, p. 897.
- STUTZER, BURRI et MAUL. — Untersuchungen über das Anpassungsvermögen von *Bacillus radicola* an einem fremden Nährboden, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. II, 1896, p. 665.
- STUTZER et HARTLEB. — Untersuchungen über das im Alinit enthaltene Bakterium, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IV, 1898, p. 31, 73.
- SÜCHTING. — Kritische Studien über die Knöllchenbakterien, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. XI, 1903, p. 377.
- TACKE. — Ueber den Stickstoff im Moorboden, *Naturf. und Ärzte zu Bremen*, 1890.
- TACKE. — Ueber die Wirkung der Kalisalze auf Moorboden, *Sitzb. Cent. Moor-Komm.*, 1896, p. 65.

- TACKE. — Versuch über die Wirkung verschieden starker Kalkgaben, *Sitzb. Cent. Moor-Komm.*, 1897, p. 58.
- TACKE. — Versuche mit Nitragin, *Mitth. Ver. Förd. Moorkult.*, t. XV, 1897, p. 398.
- TACKE. — Ueber Alinit, *Mit. Ver. Förd. Moorkult.*, t. XVII, 1900, p. 37.
- THAER. — Rationelle Landwirtschaft, 1. Aufl., 1809, t. I.
- TREVIRANUS. — Ueber die Neigung der Hülsengewächse zu unterirdischer Knollenbildung, *Bot. Zeit.*, t. II, 1853, p. 393.
- TROSCHKE. — Ueber die Kultur der Lupine in wässriger Nährlösung, *Mitth. a. d. Versuchsst. Regenwalde*. Cité dans *Biederm. Centralbl.*, 1884, p. 850.
- TRUCHOT. — Sur la fixation de l'azote atmosphérique dans les sols, *C. R.*, t. LXXXI, 1875, p. 945.
- TSCHIRCH. — Beiträge zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. V, 1887, p. 58.
- TSCHIRCH. — Ueber die Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Sitz. Ges. Naturf. Freunde zu Berlin*, 1887; *Bot. Centralbl.*, t. XXXI, 1887, p. 224.
- TSCHIRCH. — Ueber die Entwicklungsgeschichte der Bakteroiden in den Knöllchen an den Wurzeln der Leguminosen, *Tagebl. 60 Naturf. Versamml.*, Wiesbaden, 1887.
- TSCHIRCH. — Beitrag zur Kenntniss der Wurzelknöllchen der Leguminosen, *Forschr. auf d. Geb. d. Agrikulturphys.*, t. X, 1888, p. 230.
- TUBEUF (VON). — Die Haarbildungen der Coniferen, *Forst-naturw. Zeitschr.*, 1886, p. 224.
- TUBEUF (VON). — Beiträge zur Mycorrhizafrage, *Naturw. Zeitschr. f. Land. und Forstw.*, t. I, 1903, p. 67.
- TULASNE. — *Fungi hypogei*, 1862, p. 169, 198.
- VANNUCCINI. — Sull' assorbimento e diffusione dell' azoto e dei nitrati nel terreno privo di vegetazione, *Agricolt. it.*, t. XVII, 1891, p. 538.
- VIALA. — Mémoire sur le rôle de l'azote dans l'alimentation des plantes, *C. R.*, t. XLIX, 1859, p. 172.
- VILLE (G.). — Recherches sur les végétations, *C. R.*, t. XXXI, 1850, p. 578; t. XXXV, 1852, p. 464, 650.
- VILLE (G.). — Sur l'absorption de l'azote de l'air par les plantes, *C. R.*, t. XXXVIII, 1854, p. 705, 723.
- VINES. — On the relations between the formation of tubercles on the roots of Leguminosae and the presence of nitrogen in the soil, *An. of Bot.*, t. II, 1888-1889, p. 386.
- VRIES (de). — Wachsthumsgeschichte des rothen Klee's, *Landw. Jahrb.*, t. VI, 1877, p. 893.
- VUILLEMIN. — Les unités morphologiques en botanique, *A. F. A. S.*, t. XV, 2^e p., 1886, p. 514.
- VUILLEMIN. — Les tubercules radicaux des Légumineuses, *An. Sc. agr.*, 1888, t. I, p. 121.
- VUILLEMIN. — Remarques sur le mémoire de LUNDSTRÖM : « Ueber Mykodomatien... », *Jnal de Bot.*, t. II, 1888, rev. bibl., p. 49.
- WAGNER. — Stickstoffdüngung der Landwirtschaftlichen Kulturpflanzen, *D. landw. Presse*, 1893, n^o 87.
- WAGNER. — Phosphorsäure —, Kali —, Kalk — und Stickstoffdü-

gungsfragen, *Neuere Fortschr. in Wirtsch. und Bodenkult.*, heft LXIV, p. 140.

WAGNER. — Stickstoffaufnahme durch den Senf, *D. landw. Presse*, 1893, p. 901.

WAGNER. — Die geringe Ausnützung des Stallmiststickstoffs und ihre Ursachen, *Deutsche landw. Presse*, 1895, p. 92, 98.

WAGNER. — Düngungsfragen, heft IV, 1898.

WARD (Marshall). — The tubercular swellings on the roots of the Leguminosae (Prel. Note), *Proceed. Roy. Soc.*, t. XLII, 1887, p. 131.

WARD (Marshall). — On the tubercular swellings on the roots of *Vicia Faba*, *Phil. Trans.*, t. CLXXVIII, 1887, p. 539-562.

WARD (Marshall). — Die Knöllchenanschwellungen an den Wurzeln der Leguminosen, *Naturw. Rundschau*, t. II, 1887, p. 344; *Biederm. Centralbl.*, t. XVI, 1887, p. 787; anal. dans *Ann. agr.*, t. XIV, 1888, p. 330.

WARMING. — Smaa biologiske og morfologiske Bidrag, 6, *Hippophae rhamnoides*, *Bot. Tidsskr.*, 3 R., 1 Bd, 1876, p. 84-110.

WIGAND. — Bakterien innerhalb der Anschwellungen der Papilionaceen Wurzeln, *Fortschr. a. d. bot. Gart. zu Marburg*, II, 1887, p. 88.

WILFARTH. — Ueber Stickstoffaufnahme der Pflanzen, *Tagebl. d. 60 Naturf. Versamml. zu Wiesbaden*, 1887, p. 362. — *Id.*, 1890.

WILFARTH. — Die neueren Versuche mit stickstoffsammelnden Pflanzen und deren Vewertung für den landwirtschaftlichen Betrieb, *Biederm. Centralbl.*, t. XXII, 1893, p. 181.

WILFARTH. — Die Rolle der Bakterien in der Landwirtschaft, *Landw. f. d. Herz. Oldenburg*, t. XLIII, 1895, n° 2.

WINOGRADSKY. — Fixation de l'azote gazeux par les microorganismes, *C. R.*, t. CXVI, 1893, p. 1385.

WINOGRADSKY. — Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les Microbes, *C. R.*, t. CXVIII, 1894, p. 353.

WINOGRADSKY. — Absorption par les microorganismes de l'azote libre de l'air, *Arch. Sc. biol. Inst. imp. Méd. exp. St-Petersb.* (éd. franç.), t. III, fasc. IV, 1895, p. 297.

WINOGRADSKY. — *Clostridium Pasteurianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment, *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., t. IX, 1902, p. 43, 107.

WOHLTMANN. — Die Knöllchenbakterien in ihrer Abhängigkeit von Boden und Düngung, *Jnal f. Landw.*, t. L, 1902, heft IV.

WOLF. — Naturwissenschaftliche Untersuchungen einiger Ackererden Sachsens, *Landw. Jahrb.*, t. II, 1873, p. 373.

WOLFF. — Cité par KAYSER, L'assimilation de l'azote au Congrès de Berlin en 1886, *An. agr.*, t. XII, 1886, p. 521.

WOLLNY. — Ueber das Verhalten des atmosphärischen Niederschlage zur Pflanzen und zum Boden, *Fortschr. Agrik.*, t. XII, 1889, p. 423.

WOLLNY. — Neuere Forschungen auf dem Gebiete der physikalischen, chemischen und bakteriologischen Vorgänge im Boden, *Arb. d. d. landw. Ges.*, 1898, p. 57-109.

WOLLNY. — Versuche über die Wirkung des Nitragsins, *Viertelj. d. bay. Landw.*, 1898, heft II.

WORONINE. — Ueber die bei der Schwarzerle und der gewöhnlichen

Gartenlupine auftretenden Wurzelanschwellungen, *Mém. Acad. imp. Sc. St-Pétersb.*, t. X, 1866.

WORONINE. — Observations sur certaines excroissances que présentent les racines de l'Aune et du Lupin des jardins, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 5^e s., t. VII, 1867, p. 73.

WORONINE. — Bemerkungen zu dem Aufsätze Herrn MÖLLER's über *Plasmodiophora alni*, *Ber. d. d. Bot. Ges.*, t. III, 1885, p. 177.

WULFFEN (VON). — Ueber den Anbau der weissen Lupine im nördlichen Deutschland, Magdeburg, 1828.

WYDLER. — Beitrag zur Kenntniss heimischer Gewächse, *Flora*, t. XLIII, 1860.

ZABELIN. — Ueber die Bildung von salpetrigsaurem Ammoniak aus Wasser und Stickstoff, *Liebig's Annal.*, t. CXXX, 1864, p. 54.

ZINSSER. — Ueber das Verhalten von Bakterien, insbesondere von Knöllchenbakterien in lebenden pflanzlichen Geweben, *Inaug. Dis.*, Leipzig, 1897.

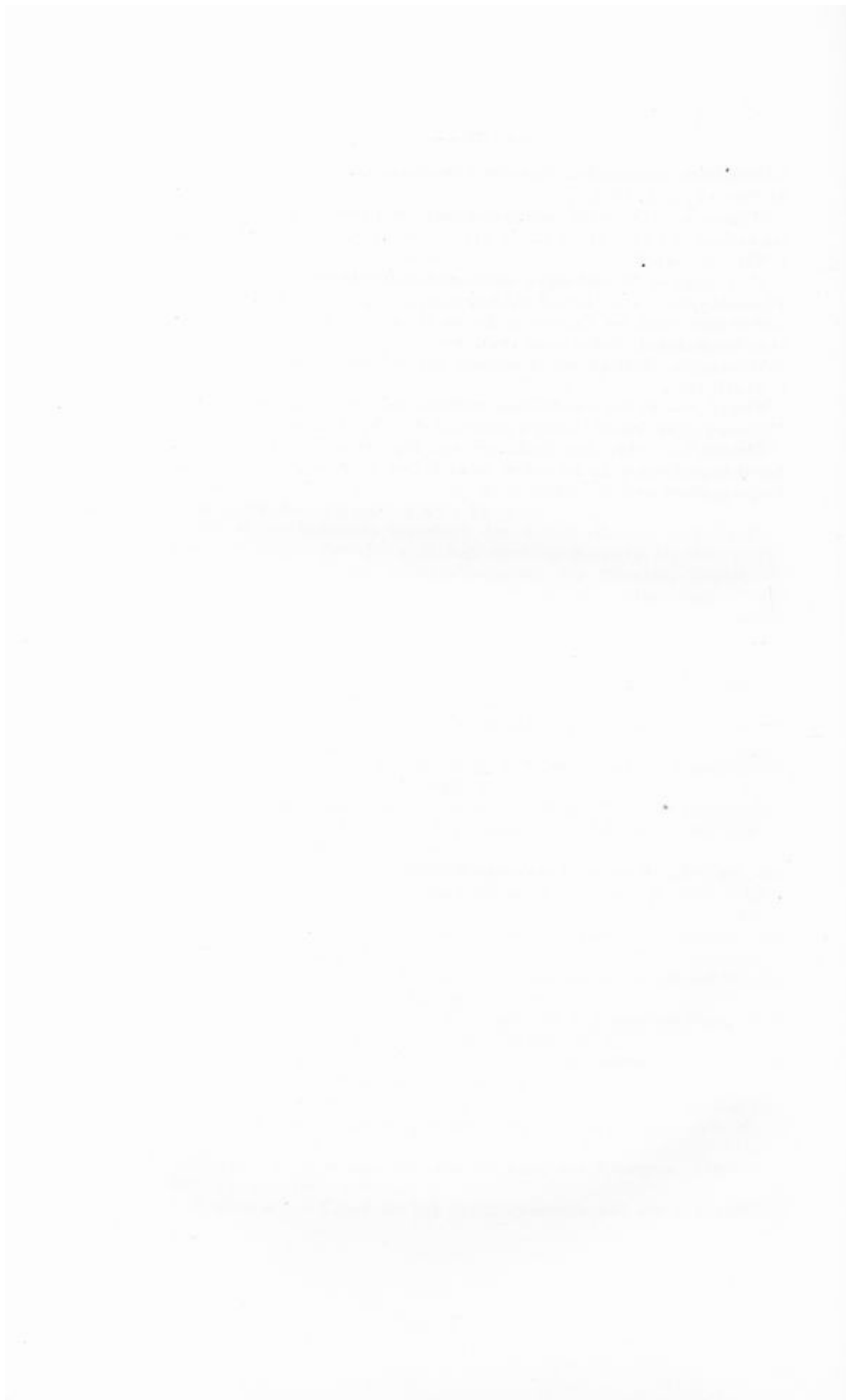


TABLE DES MATIÈRES

	Pages.
INTRODUCTION.....	1
CHAP. I. — Historique de la fixation de l'azote gazeux par le sol et les végétaux.....	5
Les plantes phanérogames appartenant à des familles autres que les Légumineuses assimilent-elles directement l'azote gazeux?.....	29
— II. — Essais de culture des microorganismes fixateurs de l'azote atmosphérique sur le sol.....	35
Recherches de WINOGRADSKY.....	35
Propriétés biologiques du <i>Clostridium Pasteu-</i> <i>rianum</i>	39
Dégénérescence du <i>Clostridium</i> en culture arti- ficielle.....	42
Conditions de la fixation de l'azote libre par le <i>Clostridium</i> et importance de cette fixation....	42
Recherches de BEYERINCK.....	45
<i>Azotobacter chroococcum</i>	46
<i>Azotobacter agilis</i>	49
<i>Granulobacter sphaericum</i>	50
Fixation de l'azote par les Bactéries oligonitro- philes.....	51
Relations de l' <i>Azotobacter</i> avec les aliments miné- raux.....	54
Action des Levures et des Moisissures sur le développement des Bactéries du groupe <i>Azoto-</i> <i>bacter</i>	54
Mécanisme de la fixation de l'azote sur le sol par les Bactéries.....	54
— III. — Fixation de l'azote par l'intermédiaire de l'alimite....	57
— IV. — Conditions générales de la fixation directe de l'azote atmosphérique par le sol. — Influence de diverses substances minérales sur ce phénomène et sur la conservation de l'azote fixé.....	65
Limitation du phénomène de la fixation.....	68

CHAP. V. — Morphologie et physiologie des tubercules radicaux des Légumineuses et des organismes qu'ils con- tiennent.....	69
Caractères extérieurs.....	70
Couleur.....	71
Répartition.....	72
Siège des nodosités.....	73
Nature des nodosités.....	74
Développement.....	77
Ordre d'apparition.....	77
Tissu générateur.....	78
Structure.....	79
Structure primaire des faisceaux.....	81
— secondaire des faisceaux.....	83
— du parenchyme.....	84
Des Bactéroïdes.....	87
Nature des filaments muqueux.....	93
Culture du microorganisme des nodosités.....	94
Essais d'acclimatation du Microbe des nodosités à d'autres milieux naturels.....	97
Culture du Microbe des nodosités dans des solutions minérales avec ou sans azote.....	97
Influence de certaines substances sur le développe- ment du Microbe des nodosités en culture arti- ficielle.....	98
Influence de l'azote minéral.....	100
— des acides.....	100
— de la chaleur.....	101
— du temps.....	102
Autres formes physiologiques obtenues en culture artificielle.....	103
Biologie des deux formes précédentes.....	103
Isolement à partir du sol du Microbe des nodo- sités.....	104
Forme <i>Oospora</i> obtenue avec le Microbe extrait du sol.....	106
Production des Bactéroïdes en culture artificielle..	108
Particularités biologiques présentées par les Bacté- roïdes en culture artificielle.....	109
Absorption directe de l'azote atmosphérique par le Microbe des nodosités en culture artificielle...	110
Nécessité de l'intervention de l'azote atmosphérique.	112
Mécanisme de la fixation de l'azote par le Microbe des nodosités.....	113
Les feuilles des Légumineuses jouent-elles un rôle dans l'assimilation de l'azote gazeux?.....	116
Influence de l'âge de la plante sur la fixation de l'azote gazeux.....	117

Développement des nodosités à la suite d'inoculations	118
Influence de l'âge des nodosités sur le succès des inoculations	120
Pénétration du Microbe des nodosités dans les racines des Légumineuses	121
Théories de la virulence et de l'immunité	122
Formation de races chez le Microbe des nodosités	123
Spécificité du Microbe des Légumineuses	128
Propriétés pathogènes du Microbe des nodosités	129
Que deviennent les nodosités ?	129
CHAP. VI. — Premières applications à la grande culture des travaux relatifs aux Bactéries des Légumineuses. — Inoculation des sols	131
Influence de la nature des sols et de l'addition de certaines substances sur le succès des inoculations	134
Influence des nitrates	134
— de l'acide phosphorique	135
— du calcaire	135
— de la chaux vive	137
— de l'humus	138
— VII. — Essais d'inoculation des sols avec des cultures pures du Microbe des Légumineuses. — « Nitragine »	139
— VIII. — Des nodosités qui se rencontrent sur les racines de plantes appartenant à des familles autres que celles des Légumineuses	145
Tubercules radicaux des <i>Alnus</i>	145
Tubercules radicaux des <i>Elæagnacées</i> , des <i>Myrica</i> et des <i>Podocarpus</i>	147
Tubercules radicaux du <i>Datisca cannabina</i>	148
De l'assimilation par les tubercules radicaux des non-Légumineuses	149
— IX. — Assimilation de l'azote par les Algues vivant en symbiose avec certaines Bactéries	151
Les Mousses microscopiques sont-elles capables de fixer l'azote libre ?	159
Les Moisissures considérées comme agents de fixation	159
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	163
TABLE DES MATIÈRES	185





