

ÉTUDE DE LA LUMINESCENCE
DU
PSEUDOMONAS LUMINESCENS

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

ANDRÉ DE COULON

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

Travail exécuté dans le Laboratoire de microbiologie de l'Université
de Genève (Professeur Chodat).

NEUCHÂTEL

IMPRIMERIE ATTINGER FRÈRES

1916

**ÉTUDE DE LA LUMINESCENCE
DU PSEUDOMONAS LUMINESCENS**

La Faculté des Sciences, sur la proposition de MM. les Professeurs O. Billeter et Ed. Béraneck, autorise l'impression de la présente thèse, sans émettre d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Le Doyen,

D^r O. FUHRMANN.

Neuchâtel, novembre 1916.

Ce travail a été fait au Laboratoire de microbiologie (Institut botanique) de l'Université de Genève, sous la direction de M. le Professeur Chodat. Je lui exprime ici ma reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer. En signe d'attachement, je lui dédie cette thèse. Je me fais aussi un devoir de remercier M. Lendner, Chef des travaux pratiques, pour les renseignements qu'il m'a donnés.

André DE COULON.

Genève, Juin 1916.

PARTIE HISTORIQUE

La luminosité d'un poisson ou de la viande de boucherie est un fait observé depuis longtemps¹. Au XVI^m siècle déjà, *Hieron* (1592) avait remarqué un cas semblable dans de la viande de mouton achetée au marché. Dans son livre *De oculo visus organo*, il en parle comme d'un phénomène connu qu'il attribue au stade peu avancé de la putréfaction ; il observa sans en tirer de conclusion la transmission de cette luminescence à un autre morceau de viande. *Bartholin* (1614), médecin à Montpellier, cite des faits analogues fort connus des bouchers et se produisant assez souvent dans le Midi de la France. Le physicien *Boyle*² étudia l'intensité lumineuse ; dans le spectre, il put distinguer différentes couleurs élémentaires. En immergeant la viande dans l'alcool et dans l'eau, l'émission lumineuse cessait, fait intéressant, mais que l'auteur n'expliqua pas. Avec *Heller* commencèrent les recherches systématiques et scientifiques ; s'étant spécialement occupé des bois lumineux, il attribuait également la luminescence de la viande à un champignon. Il écrit : « Il n'y a aucune différence entre la luminescence émise par les animaux vivants et celle provenant de la matière animale morte et en voie de décomposition ; de suite après la mort, des mi-

¹ D'après *Molisch*, *Leuchtende Pflanzen*. Jena (1904).

² *Boyle*, *Phil. Transactions* (1672) n° 89 et (1676) n° 125.

croorganismes se développent et émettent de la lumière jusqu'à un certain degré de putréfaction où toute vie bactérienne devient impossible. Les animaux pourris ne luisent plus. La viande est rendue lumineuse par des microorganismes et non par des produits de désagrégation, encore moins par des combinaisons organiques phosphorées mises en liberté. »

Malheureusement, ce travail ayant paru dans un périodique peu lu, ceux qui s'occupaient de ces phénomènes n'en eurent pas connaissance. En 1875, le physiologiste *Pflüger*¹, sans savoir que *Heller* s'était déjà occupé de ces questions, arriva au même résultat. *Hanckel*² (1862) examina au microscope cet enduit lumineux qui suintait de la viande, et remarqua que ce n'étaient ni des infusoires, ni des cryptogames et constata la présence de bâtonnets très courts et arrondis, une température de 30 degrés les tuait ; par contre, ils supportaient facilement la température de la neige fondante, une atmosphère d'acide carbonique leur était nuisible, l'oxygène activait leur luminosité. *Nuesch*³ (1877) observa la contagion de ces microorganismes et les nomma *Bacterium lucens*. *Ludwig*, en 1884, crut voir le même microorganisme dans les poissons et les viandes lumineuses ce qui, dans la suite, fut reconnu inexact.

C'est à *Beyerinck*⁴ et à *Molisch* que revient le mérite d'avoir expliqué un bon nombre de phénomènes dont la cause était encore inconnue. En 1900, *Molisch* entreprit une étude systématique de ces bactéries qu'il publia depuis sous le titre : *Leuchtende Pflanzen*. Il s'agissait de voir si cette luminosité due à des bactéries était un phénomène rare ou s'il obéissait à une loi générale. *Molisch* fit 76 essais sur de la viande de bœuf, veau, foie de bœuf de différentes provenances.

¹ Pflüger, P. « Beiträge zur Lehre von der Respiration ». *Archiv. f. d. ges. Physiol.*, etc. 10 (1875) 251-367. — 11 (1875) 222-263.

² Hanckel, W. « Notiz über phosphorisches Leuchten des Fleisches ». *Poggen-dorff Annalen d. Physik und Chemie*. 115 (1862) 62.

³ Nuesch, J. « Ueber das leuchtende Fleisch gestorbener Tiere ». *Pflügers Archiv. f. d. ges. Psychologie*. 21 (1880) 104-108.

⁴ *Archives néerlandaises*. 23 (1889) 411-428. — 24 (1891) 369-442.

48 % de ces essais donnèrent des résultats positifs, la viande ayant été placée pendant quelques jours dans un vase à l'obscurité et à une température de 9 à 12°.

La présence d'un peu de sel de cuisine facilite le développement des bactéries lumineuses. Il fit les mêmes essais en mettant la viande dans une solution de sel marin à 3 % ; le 87 % des essais fut positif, le 67 % seulement en l'absence de chlorure de sodium. Dans le premier cas, la luminosité dura trois jours, dans le second, un jour et demi environ. *Molisch* put toujours isoler dans chaque cas le microorganisme générateur de la luminescence, et constata que c'était toujours le même ; il le nomma *Bacterium phosphoreum*. Le *Bacterium phosphoreum* est aérobie, il possède des organes de locomotion, son optimum est de 16 à 18°, il se développe sur la gélatine (pas de liquéfaction), sur l'agar, la pomme de terre, le bouillon, le lait, l'urine, n'est pas pathogène et ne se trouve pas sur les poissons de mer. Cette bactérie doit être une des plus répandues, ce qui explique la luminescence de 87 % des viandes examinées ; on la trouve fréquemment dans les boucheries, abattoirs, en un mot partout où il y a de la viande.

Quoique n'étant pas pathogène, elle vit quelquefois en saprophyte chez l'homme ; on a souvent vu des cadavres lumineux. Le médecin *Percy*, 1819, remarqua à différentes reprises des blessures lumineuses. Ces cas sont rares, la bactérie ne supportant généralement pas une température supérieure à 30°.

Pour ce qui est de la luminosité des poissons de mer, *Heinrich* disait en 1817 : « Tous les poissons de mer sont lumineux après la mort ». La luminosité commence 24 heures après la mort et dure de 3 à 4 jours. *Molisch* étudia la question à Helgoland et à Trieste ; sur tous les poissons observés, il n'en trouva que deux non lumineux. Jusqu'à maintenant, on a obtenu en culture pure 30 espèces différentes de microorganismes lumineux, provenant de l'eau de mer. Les poissons d'eau douce examinés à l'obscurité ne montrent jamais des

phénomènes lumineux, si ce cas se produisait, il serait dû à une infection.

Par infection, les bactéries lumineuses peuvent très bien se fixer sur les animaux à sang froid. *Giard*¹ étudia le cas d'un petit crustacé du genre *Talitrus* dont le corps était devenu lumineux après infection par des bactéries photogènes ; il était possible par injection de leur sang de contaminer des individus sains.

*Tarchanoff*² injecte un bouillon de photobactérie à des grenouilles ; aux endroits où l'épithélium est peu épais (langue), on remarque une forte luminosité qui dure quelques jours. En 1880, *Ludwig*³ observe des taches lumineuses aux pattes des taupes produites par infection de photobactéries.

L'on trouve, dans la bibliographie, de nombreux cas d'infection d'animaux à sang froid par ces microorganismes.

¹ Giard. « Beobachtungen über die Phosphoreszenzkrankheit des Talitrus und anderen Crustaceen ». *Comptes-rendus de la Société biologique*, 1 (1889) 393.

² Tarchanoff, S. « La lumière des bacilles phosphorescentes de la Mer Baltique. *Comptes-rendus CXXXIII* (1901) 246.

³ Ludwig, F. « Ueber die Phosphoreszenz von Gryllotalpa ». *Central-Blatt für Bakteriologie, Beihefte* (1891) 412.

INTRODUCTION

Tout ce qui trouble l'atome peut donner naissance à des phénomènes lumineux. Connaissant le mécanisme des phénomènes de la luminescence, nous pouvons les classer d'après les transformations d'énergie dont ils dépendent¹. On peut diviser les phénomènes de luminescence en deux catégories.

1. La luminescence est due à une transformation *réversible*, elle peut être produite indéfiniment sur un même échantillon en le soumettant aux mêmes effets. Dans ce cas, l'équilibre intramoléculaire, détruit par une action extérieure, se rétablit spontanément lorsque cette force cesse.

2. La luminescence est liée à un phénomène *irréversible* ; elle est due à la destruction par une cause extérieure d'un état d'équilibre instable physique ou chimique.

Dans la première catégorie se rattachent les cas suivants de luminescence : photoluminescence, électroluminescence, cathodoluminescence, luminescence par les rayons canaux, luminescence par les rayons Roentgen, radioluminescence, luminescence des corps solides par les rayons de décharge.

La photoluminescence est provoquée par l'excitation parant des différents rayons du spectre et spécialement par les rayons de courtes longueurs d'onde ; suivant que le phéno-

¹ D'après Guichard, « Les phénomènes de la luminescence et leurs causes ». *Rev. générale des sciences*, 16 (1905) 683.

mène de photoluminescence cesse de suite après l'excitation ou se prolonge au delà, on parle de fluorescence ou de phosphorescence. Cette dernière s'observe surtout chez les solides et la fluorescence chez les liquides et les gaz. Il est difficile d'établir une limite entre ces deux phénomènes, ils chevauchent l'un dans l'autre comme nous le montre l'expérience de *Widmann*¹. La fluorescéine en solution est fluorescente ; si on y ajoute des quantités croissantes de gélatine à mesure que le mélange durcit la phosphorescence apparaît.

La présence de certains atomes ou de groupements d'atomes dans la molécule augmente parfois considérablement la durée et l'éclat de la luminescence, comme par exemple l'aluminium, l'uranium, les métaux alcalino-terreux et le radical acide platino-cyanhydrique pour la chimie inorganique. Dans les composés organiques, les groupements les plus actifs sont : CN, les liaisons éthyléniques, les chaînes hexagonales à deux liaisons parallèles.

Ces différents complexes sont nommés *lucigènes* ou *fluorophores*. Le rôle de ces groupes serait d'absorber les radiations lumineuses et de fournir de l'énergie à des groupes qui émettraient de la lumière (*Kaufmann*²). Dans la seconde catégorie des phénomènes de luminescence, l'équilibre dans la molécule ou dans l'atome doit être différent avant et après la luminescence, puisqu'elle ne se produit qu'une fois pour un échantillon de matière donnée. De ce groupe font partie les phénomènes de luminescence suivants : la chimie-luminescence, la luminescence autour des électrodes durant l'électrolyse d'une dissolution, la triboluminescence, la cristalloluminescence, la luminescence par précipitation, la lysis-luminescence, la thermoluminescence, la cryoluminescence et la bioluminescence des êtres vivants due vraisemblablement à une réaction de chimie-luminescence.

¹ *Widmann. Wien. Ann.* 34 (1868) 448.

² *Kaufmann et Beisswenger. Ueber Fluorescenz-Untersuchungen der Ring-systeme des Benzols. Berichte* 36 (1903) 2494. — 37 (1904) 2612.

Kaufmann. Ueber Fluorescenz. Jahr. der Rad. und Elek. 1 (1904) 339.

Le terme de *bactérie phosphorescente*, employé jusqu'à maintenant par les différents auteurs pour les bactéries qui émettent de la lumière, est impropre. Dans le présent travail, nous désignerons ces microorganismes sous le nom général de *bactéries lumineuses* et leur propriété d'émettre de la lumière : *la bio-luminescence*. D'après *Gutchar*d, cette faculté d'émettre de la lumière rentre dans la seconde catégorie des phénomènes lumineux dit irréversibles.

Beycrinck avait émis l'idée de grouper tous ces microorganismes dans un genre : *photobactérie*. Cette nomenclature ne peut guère être admise du moment que la propriété d'émettre de la lumière se trouve aussi bien chez les coques, les bactéries, les bacilles et les pseudomonas. Ce groupement des différents microorganismes lumineux n'aurait guère plus de valeur au point de vue systématique que le groupe pathogène qui comprend tous les microorganismes nuisibles à l'être humain.

Dans ce travail, nous ne chercherons pas à classer les différentes espèces de bactéries lumineuses, ni de leur trouver des constantes pour arriver facilement à les distinguer les unes des autres. Le but de cette thèse est l'étude de cette bio-luminescence, voir si elle est en rapport avec la vie ou indépendante de celle-ci, et quelles sont les conditions qu'il faut réaliser pour augmenter ou diminuer cette luminescence.

Pour que les résultats puissent être comparés les uns aux autres, il fallait autant que possible opérer dans des circonstances identiques; se servir d'un bouillon de culture ayant toujours la même composition, et de cultures ayant si possible le même âge. Nous nous sommes toujours servi dans nos expériences de bouillon liquide, pour les deux raisons que voici : en agitant un bouillon de bactéries lumineuses il devient lumineux, c'est de cette propriété là que nous nous sommes servi pour étudier l'action des différents corps sur la durée de luminosité. Un bouillon solidifié reste toujours lumineux, car les colonies bactériennes se développent à la

surface. La seconde raison est que la composition d'un milieu liquide est en tout point la même, et qu'il n'y a pas d'accumulation de produits excrétés en certains points, comme cela serait le cas pour les bouillons solides.

Nous avons toujours mesuré l'effet d'une substance quelconque sur les bactéries, en observant le temps qu'il fallait à un bouillon pour devenir obscur après avoir été agité ; si on prend une série de tubes tous égaux et contenant le même volume de bouillon avec des doses croissantes d'un excitant (alcools, cyanure de potassium, etc.), on remarque que l'obscurité arrive à se faire au bout d'un laps de temps différent dans ces divers tubes. Connaissant pour chaque tube la quantité de l'excitant ajouté, ainsi que la durée de luminosité, il est aisé de construire une courbe pour représenter l'allure du phénomène d'une manière graphique. Chaque point de cette courbe a pour abscisse la quantité de l'excitant et pour ordonnée la durée de luminosité correspondante.

Si à un bouillon de culture, on ajoute du cyanure de potassium, une petite quantité de ce sel augmente la durée de luminosité, l'optimum sera vite atteint ; si la concentration du cyanure croît, la durée de luminosité diminuera pour devenir égale à zéro lorsqu'on aura ajouté 1 cm³ de solution 0,1 n.

Pour toutes les séries d'expériences, les résultats seront graphiquement représentés ; la chose intéressante est le rapport de la durée de luminosité du tube témoin au tube contenant une quantité X de Cnk, correspondant à la durée de luminosité maximale. Si nous voulons étudier l'effet de différents corps, et comparer les courbes les unes aux autres, il faut opérer avec un même milieu de culture et au même moment. Sans cette condition, aucune conclusion ne peut être tirée, vu que le milieu de culture change d'un moment à l'autre et qu'il n'est guère possible d'en avoir deux qui soient parfaitement identiques.

Nous avons commencé ce travail en décembre 1914 avec une culture pure d'un microcoque lumineux, obtenu à par-

tir d'un poisson de mer. C'est à *Moltsch*¹ que nous devons le procédé qui nous a permis d'isoler ce microorganisme, et d'en obtenir une culture pure. Le voici en deux mots :

On place un poisson de mer dans une solution de sel-marin à 3 ‰, à l'obscurité et si possible à une température inférieure à 13°. 24 heures après, on remarque de petits points lumineux sur la peau du poisson qui émerge de l'eau. Avec un fil de platine on touche un de ces points lumineux, et on trace une série de lignes parallèles à la surface d'un milieu de culture solide (Bouillon de Molisch + agar — agar). Deux à trois jours plus tard, certains points de ces lignes deviennent lumineux, luminosité produite par une colonie qui s'est formée à partir d'un individu. Si ce point lumineux est isolé d'autres végétations microbiennes, on l'ensemence avec un fil sur un même milieu, et de la même manière que dans le premier cas. Admettons que cette petite colonie ait été pure, toutes les lignes obtenues seront uniformément lumineuses. De cette manière, nous avons une culture pure. Pour plus de précaution, nous avons encore fait un triage bactériologique par dilution, à partir de cette culture qui donnait une ligne uniformément lumineuse, et dont l'aspect macroscopique était en tout point le même.

On prélève un peu de cette culture au moyen d'un fil de platine, que l'on délaie dans de l'eau distillée (stérile). En diluant graduellement cette première dilution, on finira par avoir de l'eau ne contenant plus qu'un ou deux germes par goutte. Au moyen d'une pipette bactériologique, onensemence des flacons Erlenmeyer contenant un bouillon gélatinisé encore liquide, avec un nombre variable de gouttes. On incline l'Erlenmeyer en le tournant sous un robinet d'eau froide, la gélatine se durcit en recouvrant une grande surface. Quelques jours plus tard, on voit apparaître de petites colonies lumineuses espacées, dont le nombre est proportionnel au nombre de gouttesensemencées. Chaque colonie, si elle

¹ Molisch. *Leuchtende Pflanzen* (1904).

est assez espacée l'une de l'autre, peut être envisagée comme ayant pris naissance à partir d'un seul germe. En examinant au microscope un de ces points lumineux, on ne distingue qu'une seule espèce de microorganisme. C'est d'après ce procédé là que nous avons obtenu un microcoque lumineux en culture pure.

Nos recherches ayant été interrompues durant quatre mois pour cause de service militaire, la culture périt quoi qu'elle fût fréquemment réensemencée durant ce laps de temps. Lors de la reprise de ce travail, nous avons fait venir de l'*Institut bactériologique Kral*, de Vienne; une culture pure de « *Pseudomonas luminescens Motisch* »; toutes les recherches faites antérieurement avec le microcoque ont dû être refaites avec ce *Pseudomonas*, vu que l'on ne pouvait guère raccorder des résultats obtenus avec deux microorganismes différents.

CHAPITRE PREMIER

Étude du milieu de culture.

La première étude qui s'imposait était celle du milieu de culture. Il s'agit de voir si tous les corps chimiques constituant le milieu nutritif de *Molisch* sont nécessaires, si en évinçant l'un d'eux la bactérie ne peut vivre, ou si ces corps par une réaction chimique entre eux produisent cette luminescence; cas analogue à ceux qu'a trouvés *Radziszewsky*¹.

« S'il fallait s'en rapporter au hasard des circonstances, il serait bien difficile de pouvoir se faire une idée un peu complète des conditions biologiques et des propriétés physiologiques des espèces bactériennes. L'observateur qui veut étudier une espèce, a grand avantage de l'isoler, de la faire vivre à part à l'abri des influences défavorables de la vie en lui fournissant un aliment qui lui convient. Il est alors facile d'obtenir des notions exactes sur les phénomènes produits, sur l'action des différents agents qu'il peut employer; assuré dès lors que les résultats ne seront pas troublés par des inconnues du milieu, par des interventions étrangères². »

On a donc cherché à faire vivre les bactéries dans des milieux artificiels connus, où l'on pouvait à volonté aug-

¹ Radziszewsky. « Ueber das Leuchten der Laphinen ». *Berichte der Deutsch. chem. Gesell.* 10 (1877) 70.

² Massé. *Traité de Microbiologie.* 1 (1889) 135.

menter ou diminuer tel ou tel composant, et observer de quelle manière le microorganisme réagissait vis-à-vis de ces changements.

Les milieux organiques complexes sont les meilleurs (jus de viande, peptone); leur inconvénient, c'est que la culture y est très vivace, vu qu'elle a tout à sa disposition; après un certain temps, cette croissance se ralentit, retard qui est causé par l'épuisement du milieu ou par l'excrétion de substances toxiques, ce qui donne souvent naissance à des formes de dégénérescence.

Jusqu'à maintenant, *Molisch*¹, qui avait cultivé différentes bactéries photogènes en culture pure, se servait d'un milieu nutritif complexe, comme par exemple: du bouillon de viande ou de la peptone; ces milieux convenaient parfaitement aux recherches de ce savant, vu qu'il cherchait par ce moyen à trouver une manière de classer les différentes bactéries photogènes.

Le premier but de notre travail est différent; il s'agit d'étudier la cause de cette bioluminescence et s'il faut l'attribuer aux composants des milieux nutritifs. Pour s'attaquer à ce sujet, il importe d'abord d'être fixé sur la nutrition de ces microorganismes, tant au point de vue qualitatif que quantitatif, et de les amener à vivre en présence de corps aussi simples que possible.

Duclaux disait²: «L'aliment est toute matière à laquelle une bactérie donnée dans les conditions de l'expérience peut emprunter les matériaux de son organisation et l'énergie nécessaire pour se rendre indépendante de la chaleur solaire. Le total des actions protoplasmiques est exothermique, ce que l'on peut facilement voir à l'élévation de température du milieu. Le protoplasme peut très bien s'adresser, pour une partie de son alimentation, à des substances déjà brûlées, incapables de fournir de la chaleur par voie quelconque, à la condition de les faire entrer dans une combinaison nutri-

¹ Molisch. *Leuchtende Pflanze*. (1904) 61.

² Duclaux. *Traité de Microbiologie*. 1 (1898) 215.

tive qui, elle, en se décomposant, fournira de l'énergie. » Exemple : le ferment nitrique peut prendre le carbone dans le dioxyde de carbone si en même temps il peut oxyder KNO_2 en KNO_3 .

Les microorganismes ne peuvent pas prendre successivement le carbone dans l'acide carbonique, l'hydrogène dans l'eau et l'azote dans l'atmosphère. D'une manière générale, l'eau est nécessaire à la vie bactérienne. Elle prend son carbone dans une combinaison de cet élément ; il en est de même pour l'azote. Les êtres inférieurs ne contenant pas de chlorophylle ne peuvent assimiler le carbone à partir du dioxyde de carbone (exception pour les bactéries nitriques) ; il faudra donc mettre à leur disposition des combinaisons compliquées de cet élément, des sucres par exemple ; alors une partie du carbone sera brûlée sous forme de CO_2 , ce qui libérera l'énergie nécessaire à la vie, l'autre partie sera assimilée et servira à la construction et à l'entretien du protoplasme.

Les combinaisons inorganiques de l'azote sont généralement peu nutritives. Les bactéries préfèrent les combinaisons complexes de cet élément (albumines ou peptones) ; elles ne peuvent les assimiler tels quels, il leur faut d'abord les décomposer en corps plus simples, lesquels pourront diffuser à travers la membrane bactérienne. Ce n'est qu'à l'intérieur de leurs cellules qu'elles synthétiseront ces corps, pour en faire de nouveau des albumines qui seront spécifiques.

Quant au rôle de l'oxygène, nous en parlerons par la suite en détail ; bornons-nous à dire que cet élément est nécessaire à la vie des bactéries lumineuses, tant pour la respiration que pour les phénomènes de bioluminescence.

Le bouillon nutritif que *Molisch* employait, était constitué de la manière suivante :

125 gr. de viande hachée était macérée dans 1000 gr. d'eau durant 24 heures. On filtre au filtrat, on ajoute 30 gr. de sel marin et on porte le tout à l'ébullition (il se précipite de l'albumine qui, à son tour, est filtrée). On ajoute encore 5 gr.

de glycérine et 10 gr. de peptone. On neutralise par la soude. En ajoutant à ce milieu liquide 100 gr. de gélatine ou 15 gr. d'agar, *Molisch* obtint un milieu de culture solide.

Dans ce bouillon nutritif les bactéries se développent très rapidement ; un ou deux jours après l'ensemencement, le milieu devient lumineux. La première modification que nous avons apportée était de remplacer la glycérine, qui n'a pas de grande valeur nutritive, par de la glucose ; ainsi composé, le milieu devenait plus vite lumineux après l'ensemencement et surtout l'intensité lumineuse en était augmentée. *Molisch* neutralisait le milieu par de la soude jusqu'à faible réaction alcaline ; ceci est nécessaire, car les bactéries en général, et celles-ci en particulier, sont très sensibles à l'action des acides. Les matières albumineuses en se désagrégant donnent naissance à des acides, l'hydrolyse se poursuivant, le milieu devient alcalin par mise en liberté d'ammoniaque.

Après quelques jours, l'excès de soude est neutralisé par la production d'acide. Ce dernier étant en excès, la bactérie périra ; pour éviter cela, nous avons ajouté du carbonate de calcium en excès ; il se forme un dépôt qui, au fur et à mesure du besoin, se décompose et neutralise les acides formés en dégageant de l'acide carbonique. Le carbonate de calcium peut très bien être remplacé par le carbonate de magnésie. Dans ces conditions, le temps que le bouillon met pour arriver à être lumineux est augmenté.

De cette manière, nous avons obtenu des bouillons qui sont restés lumineux durant plusieurs semaines, ce qui n'était pas le cas auparavant.

Étude de la source d'azote.

La source d'azote dans le bouillon de culture de *Molisch* était les albumines dissoutes dans l'eau par macération de la viande, et la peptone. Ce savant, dans son livre intitulé

Leuchtende Pflanzen, indique une formule pour remplacer l'extrait de viande par des sels minéraux additionnés de peptone. Le nouveau bouillon aura la composition suivante :

Sulfate de magnésium	0,25 gr.
Sulfate de potassium	0,25 »
Peptone	10 »
Sucre.	20 »
Sel de cuisine	30 »
Eau	1000 »

La peptone est une substance azotée non cristallisable, de constitution chimique inconnue, et dont le degré de pureté est très relatif. Ce corps provient de l'albumine par hydrolyse ; ne serait-il pas possible de la remplacer par des produits plus avancés de cette désagrégation, comme par exemple par les acides aminés qui sont le dernier stade de l'hydrolyse ?

*Garham*¹ obtient des cultures de bactéries lumineuses dans un milieu fort simple contenant seulement de l'asparagine comme source d'azote. *Fränkel*² alla plus loin, il se servait de lactate d'ammonium comme porteur d'azote.

Nous voyons ainsi qu'il est possible de remplacer la peptone par des corps plus simples. Nous avons essayé les corps azotés énumérés plus loin, en prenant soin de mettre toujours une quantité équivalente au point de vue azote à 1 gr. de peptone (1 gr. de peptone contient 0,13 gr. d'azote).

La peptone contenant du phosphore, si nous voulons remplacer cette substance protéique par un acide aminé, nous devons ajouter au milieu de culture un sel de phosphore ; cet élément entre dans la constitution des acides nucléiques. *Detmer*³, dans sa solution nutritive pour les algues, emploie le phosphate de potassium dans la proportion de

¹ Garham, F.-C. « Die Leuchterzeugende Baktener ». *Centralblatt für Bakteriologie*. Jéna. 13 (1904) 227.

² Fränkel, C. « Beiträge zur Kenntnis der Bakterienwachstum auf erweiss-freien Nährboden. » *Hygienische Rundschau*. 4 (1894) 769.

³ Detmer. *Das Pflanzenphysiologische Praktikum*. Jéna (1888) 4.

0,12 gr. $\frac{0}{100}$. Nous en avons mis la même quantité dans le bouillon de *Molisch* modifié.

Voici les matières azotées :

Glycocolle	M = 75	0,69 gr.	} Chacun contient le même poids de N (0,13 gr.) que 1 gr. de peptone.
Alanine	M = 89	0,82 »	
Asparagine	M = 132	0,61 »	
Urée	M = 60	0,28 »	
Uréthane	M = 89	0,82 »	
Thiurée	M = 76	0,35 »	
Carbamate d'ammonium	M = 78	0,36 »	
Tartrate d'ammonium .	M = 167	1,55 »	
Amygdaline	M = 511	0,17 »	
Tyrosine	solubilité $2 \frac{0}{100}$ environ.		
Acétamide	M = 59	0,54 »	
Formamide	M = 47	0,43 »	
Azotite de sodium . .	M = 69	0,64 »	
Azotate de potassium .	M = 101	0,92 »	
Carbonate d'ammonium	M = 96	0,44 »	
Azotate d'ammonium .	M = 80	0,37 »	

Nous avons fait 16 milieux de culture différents où la peptone à 1 % est remplacée par un des corps ci-dessus indiqués en quantités calculées d'après la teneur en azote.

Les tubes contenant de		sont lumineux
l'asparagine ou de la glycocolle	2 jours après l'ensemencement.	
l'urée, ou NO_2NH_4	4	»
la formamide	7	»
tartrate d'ammonium	8	»
salpêtre	14	»
alanine	16	»

Les tubes contenant de l'amygdaline (dégagement de CNH ?), de l'azotite de sodium, du carbonate d'ammonium, de l'acétamide, de l'uréthane, du thiurée, du carbamate d'ammonium, de la tyrosine ne deviennent jamais lumineux.

Nous avons fait deux séries d'essais ; la première série contenait en plus du bouillon de *Molisch* modifié, une cer-

taine quantité de carbonate de calcium, la seconde série n'en contenait pas. Seuls les tubes de la première série donnèrent les résultats indiqués ci-dessus, ceux de la deuxième série ne furent lumineux que dans la suite, et la luminescence ne dura pas longtemps. Le tube qui contenait l'urée comme source d'azote sans adjonction de craie ne devint jamais lumineux.

Cohn¹ avait déjà réussi à cultiver le *Bacterium termo* en présence d'urée comme source de l'azote, mais il n'obtint des résultats positifs qu'en présence de sucre ; Fischer² arriva au même résultat pour le *Bacillus subtilis*. Beaucoup de savants s'étaient déjà occupés à simplifier les milieux de cultures, en donnant à la bactérie comme source d'azote des corps de plus en plus simples. C'est ainsi que Fischer² cultiva le *Bacterium coli*, *Bacillus cholerae*, *Bacillus typhi* en présence de sels d'ammonium, par contre, le *Bacillus pyocyaneus* et le *Bacillus fluorescens* se laissent cultiver en présence de glycérine sur des nitrates. Beyerinck obtint des résultats identiques avec le *Streptothra chromogenes* en présence de nitrate, ou de nitrite, ou d'asparagine, ou de peptone.

Nous sommes en contradiction avec cet auteur³ qui prétend que ni les nitrates, ni les nitrites, ni les combinaisons ammoniacales, ne peuvent servir de source d'azote aux bactéries lumineuses. L'expérience nous a montré que l'azotate de potassium, l'azotate d'ammonium et le tartrate d'ammonium peuvent très bien servir de source d'azote à la bactérie lumineuse, et que sa fonction photogénique n'en était pas diminuée pour cela.

Les cultures étaient conservées pour le reensemencement sur des milieux solides à base de peptone et d'agar ; si on ensemait les bactéries sur un milieu différent, contenant de l'urée par exemple à la place de peptone, il leur fallait

¹ Cohn. *Centralblatt für Bakteriologie*. T. I (1895) 412.

² Fischer. *Ibidem*.

³ Beyerinck. *Archives néerlandaises*. 24 (1891) 388.

quatre jours pour arriver à un développement tel, que le milieu soit lumineux ; un jour seulement suffisait si on ensemençait ce dernier milieu, à partir d'un bouillon de culture contenant de l'urée. On voit clairement que l'accoutumance joue un grand rôle dans la vitesse du développement de ces bactéries. Il en est de même pour tous les différents milieux de culture.

Ayant étudié au point de vue qualitatif les substances azotées qui pouvaient remplacer la peptone, étudions maintenant ce problème d'une manière quantitative et cherchons quelle sera la quantité de ces différents corps qui donneront les meilleurs résultats.

Glycocolle.

Au bouillon minéral de *Moltsch*, ajoutons des quantités de glycocolle variant de 0,1 % à 2 % et observons quelle est la concentration de glycocolle qui donnera le meilleur résultat.

			Luminosité après 4 jours.
I.	} Liquide minéral de Moltsch + 2 % de glucose.	+ 0,1 % de glycocolle.	faible.
II.		0,4	» . . . faible.
III.		0,6	» . . . forte.
IV.		0,8	» . . . forte.
V.		1	» . . . nulle.
VI.		1,5	» . . . nulle.
VII.		2	» . . . nulle.

Lorsque la concentration du glycocolle est de 0,6 à 0,8 %, le développement du *Pseudomonas* est le plus rapide. La concentration du glycocolle avec laquelle la bactérie dans le temps le plus court donne le maximum de luminosité se trouve précisément être celle qui correspond à un poids d'azote équivalant à 1 gr. de peptone. Dans les essais cités ci-après, c'est cette quantité de glycocolle que nous employons toujours.

Asparagine.

Même série d'essais que celle faite avec le glycocole.
Liquide minéral de *Molisch* + quantité variable d'asparagine de 0,5 % à 3 %.

I.	Liquide de Molisch + 2 % de glucose + 0,5 % asparagine
II.	» 2 » 1 »
III.	» 2 » 1,5 »
IV.	» 2 » 2 »
V.	» 2 » 2,5 »
VI.	» 2 » 3 »

Un jour après l'ensemencement un seul était lumineux.
Les autres tubes restent obscurs. 0,5 % correspond à peu de chose près au poids calculé d'asparagine contenant 0,13 gr. de N (0,61).

Alanine.

Même série d'essais que pour le glycocole et l'asparagine.
Liquide minéral de *Molisch* + quantité variable d'alanine de 0,119 % à 1,78 %.

			Correspondent au point de vue N.	
I.	Liquide minéral de Molisch + 2 % glucose.	{	+ 0,12 % d'alanine à 0,1 % glycocole.	
II.			0,46 » 0,4 »	
III.			0,71 » 0,6 »	
IV.			0,94 » 0,8 »	
V.			1,18 » 1,0 »	
VI.			1,78 » 1,5 »	

17 jours après l'ensemencement, IV est lumineux, les autres tubes restent obscurs. Dans la série analogue faite avec le glycocole, nous avons trouvé que lorsque ce corps entrait dans la proportion de 0,6 à 0,8 % dans le milieu de culture, c'était celui qui remplissait les meilleures conditions pour le développement du *Pseudomonas*. Ce qui correspond à 0,94 % d'alanine.

Tyrosine.

Même série d'essais que pour les corps ci-dessus. Tous les résultats sont négatifs, il faut attribuer cela au peu de solubilité de ce corps qui est d'environ 2^o/₁₀₀.

Nous résumerons en disant que le *Pseudomonas luminescens* peut prendre l'azote nécessaire à son entretien à des combinaisons les plus diverses, tant organiques qu'inorganiques; des corps aussi complexes que la peptone et l'albumine ne sont pas absolument nécessaires, contrairement à ce que l'on croyait.

C'est d'une grande importance pour nous, car de cette manière on pourra avoir un milieu de culture qui ne contiendra que des substances connues, et les essais avec des corps chimiquement définis seront possibles.

Étude de la source de carbone.

Les sources de carbone que nous étudierons seront les différents sucres. En 1890, *Beyerinck*¹ ne connaissait que cinq bactéries lumineuses, deux d'entre elles, les *Photobacterium phosphoreum* et *P. Pflügeri*, demandent pour se développer et devenir lumineuses un corps peptonique qui fournit de l'azote, et une seconde matière, azotée ou non, comme source de carbone; il ajoutait alors de l'asparagine ou de la glycérine, de la glucose ou de la fructose comme matières carbonées, qui fermentaient en dégageant de l'acide carbonique et de l'hydrogène et donnant naissance à des acides. Il appelle ces bactéries des *peptones carbonées bactériques*.

Le même auteur désignait par *bactérie à peptone* celle qui n'avait besoin pour se développer que de la peptone, ce qui est le cas pour les *Photobacterium luminum* et *P. indicum*; il augmentait le pouvoir lumineux en ajoutant de

¹ *Archives néerlandaises* 2A (1891) 367-392.

l'asparagine, elle supportait mal la saccharose; 0,1g était déjà une dose mortelle.

Il est dommage que *Beycinck* n'ait pas cherché à obtenir des milieux plus simples en remplaçant la peptone par une autre source d'azote, et fait ses recherches sur des milieux liquides. Des substances aussi complexes que l'agar, la gélatine et la peptone peuvent être les causes de beaucoup d'erreurs. Il ne serait pas impossible que les bactéries prisent le carbone nécessaire à leur entretien à la peptone ou à l'agar (qui est un galactosane) et de cette manière le sucre devient un aliment dispensable.

Depuis les travaux de *Pasteur*, 1856, on sait que le sucre ainsi que l'acide tartrique sont des aliments pour les microorganismes.

Molisch, dans ses milieux nutritifs pour les bactéries lumineuses, employait 2% de saccharose.

La première série d'essais que nous fîmes consistait à voir si la saccharose est préférable aux sucres intervertis pris séparément ou à un mélange de ceux-ci.

I.	Liquide de Molisch + gluco-colle + 2 % glucose.
II.	» » 2 fructose.
III.	» » 2 saccharose.
IV.	» » 4 glucose + 1 % fructose.
3 jours après l'ensemencement	III est très lumineux.
4 » »	I est peu lumineux.
5 » »	IV » et I très lumineux.
10 » »	II est très lumineux.

Le poids du carbone pour ces quatre sucres est sensiblement le même (pour la saccharose il est un peu supérieur). Par contre, l'augmentation de la pression osmotique n'est pas la même pour ces quatre milieux; elle sera environ double pour les bouillons nutritifs I, II et IV, vu qu'il y a le double de molécules d'hydrate de carbone que dans le milieu III. Nous reviendrons sur ce sujet dans le chapitre suivant.

Dans la suite, sauf indication spéciale, ce sera la saccharose que nous emploierons.

Étude de la valeur des différents hydrates de carbone.

Comme nous l'avons fait pour les corps azotés, il s'agissait de voir quels seraient les hydrates de carbone qui pourraient être décomposés par le *Pseudomonas* en lui fournissant de l'énergie pour la vie et du carbone pour son entretien. Voici ces différents sucres que nous avons essayés :

Erythrite (alcool en C₄).

Arabinose et xylose (sucre en C₅).

Dulcité, mannite, mannose, glucose, fructose, galactose (alcools et sucre en C₆).

Saccharose, lactose, maltose, raffinose (bioses et trioses).

Polygalyte (sucre cyclique).

Ces différents essais ont été faits avec le liquide minéral de *Molisch*, additionné d'urée comme source d'azote.

3 jours après l'ensemencement, les tubes contenant les érythrite, mannite, dulcité, mannose, glucose, galactose, maltose, saccharose sont lumineux.

6 jours après l'ensemencement, les tubes contenant les fructose et xylose sont lumineux.

15 jours après l'ensemencement, le tube contenant l'arabinose est lumineux.

Résultats négatifs avec les tubes contenant la polygalyte, la raffinose, la lactose.

De ceci, nous pouvons conclure que le *Pseudomonas luminescens* peut excréter les deux ferments suivants : sucrase et maltase ; par contre, il lui est impossible de dédoubler la lactose (absence de lactase et absence de raffinase qui décomposerait la raffinose en une biose, la mélibiose qui, à son tour, serait décomposée en galactose et glucose).

La constitution des différents sucres joue un grand rôle.

Dans la nutrition des microorganismes, de même que *Pasteur* avait démontré que le *Bacillus acidi lactici* n'attaquait que l'acide lactique droit lorsqu'on lui donnait un mélange d'acide lactique droit et gauche, nous voyons que le *Pseudomonas* préfère les hexoses aldoses aux hexoses cétoles (fructose).

*Buchner*¹ cite un cas analogue au sujet des sels d'ammonium des acides fumarique et maléique (acides qui ne diffèrent l'un de l'autre que par la position relative dans l'espace des groupes COOH) : seul le premier de ces deux acides est attaqué par les bactéries acétiques. Il est remarqué que cet acide fumarique se trouve souvent chez les plantes, tandis que son isomère n'a encore jamais été remarqué dans le règne végétal. D'une manière générale, on peut affirmer que l'assimilation d'un corps quelconque se fera d'autant plus facilement que sa constitution est plus rapprochée des substances qu'il est appelé à former ou à remplacer².

D'après *Loeb*³, les bactéries ne peuvent assimiler telles quelles l'érythrite, la dulcitol et la mannitol (alcools hexa- et tétravalents), mais doit d'abord transformer le

chaînon $\begin{array}{c} \text{N} \\ | \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ | \\ \text{R} \end{array}$ dans le chaînon $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C} = \text{O} \\ | \\ \text{R} \end{array}$ qui, lui, est

assimilable, ce qu'on peut vérifier de la manière suivante.

Nous avons pris deux Erlenmeyers contenant comme milieu de culture du bouillon minéral de *Molisch*, plus de l'urée (source de N) et de la mannitol comme source de carbone ; ensemençons un de ces Erlenmeyers, l'autre servant de témoin ; quinze jours après l'ensemencement, nous portons le milieu de culture à l'ébullition, pour tuer les bactéries lumineuses qui se sont développées. Ce bouillon-là réduit la liqueur de Fehling, ce qui n'est pas le cas pour le milieu de

¹ Buchner. *Berichte der Deutschen Chem. Gesell.* 25 (1892) 1161.

² Nägeli. « Untersuchungen über mehrere Pilze ». *Zeitschrift für Biologie.* (18 1882) 543.

³ Loeb, Jacques. *La dynamique des phénomènes de la vie.*

culture qui n'a pas étéensemencé, et qui sert de témoin. De cela, nous avons conclu que la mannite, qui n'a aucun pouvoir réducteur, aurait été transformée en mannose qui, elle, réduit la liqueur de Fehling.

Les corps chimiques qui diffusent facilement à travers la membrane cellulaire n'ont pas nécessairement une petite molécule, cela dépend seulement de leur solubilité dans la membrane protoplasmique. *Overton* fit la remarque que certains des alcools supérieurs à grande molécule traverse très facilement la membrane cellulaire, beaucoup plus rapidement que ne le font les corps à molécule plus simple. Devrions-nous attribuer à cela l'effet rapide des alcools polyatomiques sur le développement du *Pseudomonas*, les alcools seraient oxydés à l'intérieur en leur sucre correspondant qui diffuserait ensuite à l'extérieur, ce qui nous aurait permis de les déceler.

*Beyerinck*¹, qui étudia bon nombre de corps au point de vue de leur valeur nutritive et de leur influence sur la luminosité, trouva que les alcools mono- et polyatomiques (dulcité et mannite), les hydrates de carbone, comme l'amidon, l'inuline, la lactose, et la plupart des acides organiques n'avaient aucune influence sur la production de la lumière. Pour le *Pseudomonas*, nous avons trouvé tout juste le contraire pour ce qui est de la dulcité et de la mannite; par contre, la lactose nous a aussi donné un résultat négatif.

Glycérine.

La glycérine ne peut pas à elle seule remplacer les sucres comme source de carbone, cet essai a été fait avec le liquide minéral de *Molisch*, plus l'asparagine.

¹ Beyerinck. *Archives néerlandaises*. 24 (1891) 411.

Diminution graduelle de la saccharose.

Ne serait-il pas possible de diminuer graduellement le sucre dans un milieu de culture et habituer petit à petit le microorganisme à se passer de cet aliment, et de prendre à une autre source le carbone nécessaire à son entretien ? Pour faire cette expérience, nous nous sommes servi du bouillon minéral de *Molisch* additionné d'urée ; on pourrait supposer que ce corps, en se transformant en carbonate d'ammonium, libérerait l'énergie nécessaire à la vie de la bactérie et pourrait fournir à la plante le carbone nécessaire à sa croissance.

I. Liquide de Molisch + urée + 2 % glucose.			
II.	»	»	1
III.	»	»	0,75
IV.	»	»	0,5
V.	»	»	0,25
VI.	»	»	0,14
VII.	»	»	0,04
VIII.	»	»	0,00

Le 20 déc.	2 tubes de I	sont ensemencés	le 22 déc.	les 2 tubes	sont lumineux.
Le 22 »	»	II	»	le 23 »	»
Le 23 »	»	III	» avant	le 28 »	»
Le 28 »	»	IV	»	le 4 janv.	»
Le 5 janv.	»	V	»	le 8 »	1 tube est lumineux.
Le 8 »	»	VI	»	le 10 »	1 »
Le 14 »	»	VII	»	le 17 »	1 »
Le 20 »	»	VIII	»	le 1 ^{er} fév.	les 2 tubes sont lumineux très faiblement et la luminosité ne dura pas.

Ces différents essais ont été ensemencés les uns à partir des autres, par exemple : II est ensemencé avec le bouillon lumineux de I, III avec II et ainsi de suite.

Le sucre active la luminescence et les tubes qui en contiennent beaucoup resteront plus longtemps lumineux. Le temps qui s'écoule entre l'ensemencement et l'apparition de

la luminosité est sensiblement le même dans ces sept essais différents, la seule chose qui diffère est l'intensité et la durée de luminosité.

Serait-il possible au *Pseudomonas luminescens* de se servir du carbone de l'urée pour son développement, mais seulement pour une courte période, car le tube ne contenant pas de sucre ne fut lumineux que durant deux jours ?

Étant fixé sur le poids des substances azotées et carbonées qui conviennent le mieux à la culture du microorganisme, il faudrait encore trouver le rapport de ces deux corps le plus favorable.

Pour cela nous avons fait deux séries d'essais: dans la première série l'asparagine variera et le sucre sera constant, l'inverse aura lieu pour la seconde série.

I. *Asparagine variable, sucre constant.*

I.	Liquide Molisch + 2 % glucose + 0,5 % asparagine.
II.	» 2 » 1 »
III.	» 2 » 1,5 »
IV.	» 2 » 2 »
V.	» 2 » 2,5 »
VI.	» 2 » 3 »

Un jour après l'ensemencement I est lumineux, les autres tubes ne le deviennent jamais. A l'avenir les milieux de culture contiendront toujours 0,5 (0,61) % d'asparagine.

II. *Asparagine constante, sucre variable.*

I.	Liquide Molisch + 0,61 % asparagine + 1 % glucose.
II.	» 0,61 » 1,5 »
III.	» 0,61 » 2 »
IV.	» 0,61 » 2,5 »
V.	» 0,61 » 3 »
VI.	» 0,61 » 3,5 »

Un jour après l'ensemencement II, III, IV, V, VI sont lumineux. La différence de luminosité est petite, VI l'est le plus. A l'avenir les milieux contiendront toujours 2 % de sucre.

D'après ces essais on remarque que le meilleur rapport entre la matière azotée et la matière carbonée est X % de cette substance azotée (c'est-à-dire celle qui contiendra 0,13 gr. de N) et 2 % de sucre.

Ce rapport entre le carbone et l'azote organiques étant établi, il s'agit de voir si des fractions des poids optimum permettent la vie bactérienne si dans ces solutions diluées le dégagement de lumière a lieu.

I.	Liquide Molisch	+ 0,69 %	glycocolle	+ 2 %	glucose.
II.	»	0,35	»	1	»
III.	»	0,17	»	0,5	»
IV.	»	0,08	»	6,25	»

3 jours après l'ensemencement I, II, III, sont lumineux ; IV est resté obscur.

Nous voyons ainsi que le *Pseudomonas luminescens* peut très bien se développer avec le quart seulement des concentrations habituelles des substances azotées et carbonées.

Influence des sels du milieu de culture modifié de Molisch.

Pour 1000 gr. d'eau il contient les corps chimiques suivants :

0,25 gr.	MgSo ₄
0,25 gr.	K ₂ So ₄
0,12 gr.	K ₂ HPO ₄
2,8 gr.	d'urée.
20 gr.	glucose.
30 gr.	NaCl.

Il y a deux manières différentes d'étudier les aliments minéraux qui sont nécessaires aux microorganismes¹ :

¹ Rautin. « Étude chimique sur la végétation. » *Annales des Sciences Naturelles*. Paris 1870.

1° c'est de faire une analyse quantitative et qualitative des cendres; de cette manière là on voit quels sont les métaux qui paraissent servir à la nutrition de la bactérie.

2° de cultiver les microorganismes dans des bouillons desquels on évincera à tour de rôle tel ou tel métal; en observant le développement de la bactérie dans ces différents milieux, on conclura à la nécessité de ces métaux ou à la possibilité d'en éliminer.

C'est ce second procédé plus sûr que nous avons choisi :

Dans des éprouvettes paraffinées (pour éviter une dissolution aussi petite soit-elle du verre à la température de la stérilisation) faisons six milieux de cultures différents où chaque fois un des composants du bouillon nutritif manquera à tour de rôle. Ces différents essais donnèrent des résultats négatifs, à part ceux qui contenaient le sulfate de potassium et le sucre en moins. Le potassium se trouve encore dans le bouillon sous forme de phosphate dibasique de potassium, ce résultat n'est donc pas concluant du tout en ce qui concerne le potassium et le soufre, car il n'y a pas absence de potassium et de soufre dans ce milieu là, mais simplement une concentration plus faible.

Le magnésium est un aliment nécessaire. *Molisch*¹ avait déjà vu qu'en retranchant ce sel la culture restait stérile après l'ensemencement.

L'Américain *Mac Kenny*² put obtenir une culture de bactéries lumineuses sans magnésium, mais cet auteur ne travaillait pas avec des substances chimiquement pures, il se servait de peptone, qui étant d'origine animale doit probablement contenir cet élément.

Le soufre est nécessaire ainsi que le phosphore puisque les nucléines qui sont des composants du noyau en contiennent.

Le tube qui ne contenait pas de sucre a une luminosité très faible et de courte durée (24 heures).

¹ Molisch. *Sitzung der K.A.K. Gesellschaft Wien*. 103 (1894) 554.

² Mac Kenny. *Proc. biol. soc. of Washington*. 15 (1902) 223.

Peut-on remplacer le NaCl par un autre électrolyte.

Jacques Loeb, dans son ouvrage intitulé *La dynamique des phénomènes de la vie*, admet qu'il existe deux espèces de substances dans les solutions nutritives.

1° Les substances nutritives proprement dites, soit dans notre milieu de culture : K_2SO_4 , $Mg SO_4$, K_2HPO_4 , sucre et urée ;

2° les substances protectrices représentées chez nous par le chlorure de sodium dont le but serait d'élever la pression osmotique du bouillon de culture jusqu'à une valeur qui permette aux bactéries lumineuses de vivre.

Dans le § précédent nous avons vu que tous les sels du bouillon de *Motisch* étaient nécessaires à la bactérie pour la constitution de son protoplasme. *Motisch* avait déjà cherché à remplacer le NaCl par d'autres électrolytes, avec anions et cations différents, au lieu de prendre pour chaque sel des poids variables qui auraient produit des solutions isotoniques ; *Motisch* prit presque toujours la même concentration de ces différents électrolytes. Il est facilement concevable que pour un même poids d'azotate de potassium et de chlorure de sodium le nombre des molécules ne sera pas le même, aussi, pour avoir des pressions osmotiques égales avec ces deux corps, faudra-t-il prendre une plus grande concentration de salpêtre.

Nous savons qu'une solution à 3 % de NaCl abaisse le point de congélation de l'eau de $1,759^\circ$; prenons pour l'électrolyte qui remplacera le chlorure de sodium une quantité qui abaissera d'autant le point de congélation.

Prenons du bouillon de *Motisch* additionné de glucose et faisons neuf milieux différents où chaque fois le 3 % de NaCl sera remplacé par les électrolytes suivants :

I.	NaCl	3,099 gr.	} dans 100 d'eau abaisse la température de congélation de 1.759°.
II.	KCl	3,58 gr.	
III.	CiNH ₄	2,78 gr.	
IV.	MgCl ₂ , 10 H ₂ O	7,05 gr.	
V.	CaCl ₂	3,75 gr.	
VI.	Na ₂ SO ₄ , 10 H ₂ O	14,7 gr.	
VII.	NaNO ₃	4,50 gr.	
VIII.	KNO ₃	6,60 gr.	
IX.	SO ₄ (NH ₄) ₂	9,5 gr.	
X.	R ₂ K	6,35 gr.	

2 jours après l'ensemencement, V, IV, VII, X sont très lumineux; I, III, IX sont peu lumineux.

3 jours après l'ensemencement, I, III, IX sont très lumineux, et II, VI, VIII, sont peu lumineux.

Tous ces électrolytes donnèrent de bons résultats à part le chlorure de potassium, le salpêtre et le sulfate de sodium.

De cette expérience résulte le fait que le sel marin n'est pas nécessaire au développement du *Pseudomonas*, ce sel pouvant très bien être remplacé par un autre électrolyte avec cation et anion différents, pourvu que la pression osmotique du milieu ait une valeur égale à celle d'une sol. à 3 % de NaCl.

CHAPITRE II

Influence et rôle de l'oxygène dans la bioluminescence du « *Pseudomonas luminescens* ».

L'oxygène est nécessaire pour provoquer et entretenir la bioluminescence. Ce fait est connu depuis longtemps ; déjà Boyle en 1783 avait remarqué qu'en mettant des poissons, rendus partiellement lumineux par des bactéries photogènes, sous une cloche où le vide était fait, la luminescence disparaissait et ne se reproduisait qu'avec l'entrée de l'air.

De même un bouillon liquide de bactéries lumineuses au repos n'a que son ménisque supérieur lumineux, puisque cette surface seule est en contact avec l'air atmosphérique. En agitant le bouillon, l'oxygène pénétrera dans les couches profondes et tout le liquide deviendra lumineux. C'est pour la même raison que la mer ne présente des phénomènes de luminescence que lorsqu'elle est agitée (*Pflüger*).

*Beyerinck*¹, qui étudia le besoin d'oxygène de différentes bactéries, trouva pour le *Photobacterium* (bactérie qui fait fermenter le sucre) que l'oxygène nécessaire à son cycle vital

¹ Beyerinck. « Les bactéries lumineuses dans leur rapport avec l'oxygène. » *Archives néerlandaises*. 23 (1889) 417.

se trouvait sous deux formes de liaisons : « Outre l'oxygène fixé nécessaire pour l'anérobiose et que nous appellerons « Oxygène excitateur », il y a dans le protoplasme encore une seconde liaison entre l'oxygène et la substance vivante, celle de l'oxygène libre qui rend possible la fonction photogénique et qui se laisse comparer à l'oxygène servant à la respiration ordinaire des cellules tant lumineuses que non lumineuses. »

Ces bactéries sont très avides d'oxygène, elle ont la possibilité d'absorber tout l'oxygène se trouvant dans leur milieu de culture. Si dans un bouillon lumineux on ajoute de l'hydrosulfite de sodium qui se changerait en sulfite en présence de traces d'oxygène, cette oxydation n'aura pas lieu, et les bactéries continueront à être lumineuses, puisqu'elles se sont emparées de tout l'oxygène ; celui-ci étant à l'intérieur de la cellule, toute diffusion devient impossible. L'oxygène n'est pas à l'intérieur de la cellule sous forme de dissolution physique, ni sous forme de fixation lâche comme l'oxyhémoglobine, car le vide le plus rigoureux ne peut faire lâcher prise à l'oxygène fixé dans le protoplasme vivant pour la bioluminescence.

L'hydrosulfite et le blanc d'Indigo, que l'on considérait jusqu'à maintenant comme des réactifs des plus sensibles vis-à-vis de l'oxygène, sont mis en état d'infériorité à côté des bactéries lumineuses qui émettent une luminescence avec des traces d'oxygène que ni le blanc d'Indigo, ni l'hydrosulfite de sodium ne peuvent déceler.

Si dans un bouillon de bactéries lumineuses au repos (obscurité), nous ajoutons du blanc d'Indigo et que nous agitions le milieu de culture, de l'oxygène pénétrera, et de suite on aura une vive luminescence ; seulement, s'il y a un excès d'oxygène, c'est-à-dire s'il y a plus de ce gaz que les bactéries n'en peuvent fixer, on verra le liquide se colorer en bleu par oxydation du blanc d'Indigo. Nous pouvons donc nous convaincre de cette manière, que l'affinité de l'oxygène pour les bactéries lumineuses est plus grande que pour le blanc d'Indigo. Cependant, nous verrons dans

la suite qu'elles sont aussi capables de réduire ce corps.

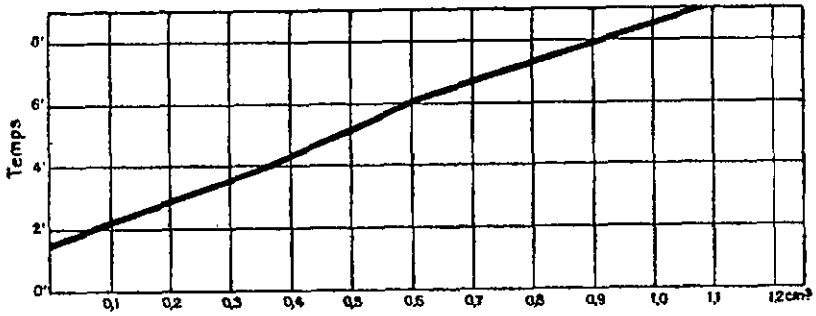
Une question importante à élucider est de savoir si les bactéries lumineuses enlèvent complètement l'oxygène au milieu ambiant, ou seulement jusqu'à ce que celui-ci ait une tension minima. *Beyerinck* cite le fait que le bleu d'Indigo à l'état dissous ne perd pas son oxygène lorsqu'on le met dans le vide barométrique; donc il n'y a pas de raison d'admettre l'existence d'une certaine tension d'oxygène minima à laquelle l'Indigo se changerait en son leucodérivé. Il en résulte que le blanc d'Indigo peut prendre les dernières traces d'oxygène au milieu ambiant, en raison de son affinité pour ce gaz. S'il est possible au blanc d'Indigo de prendre dans un liquide jusqu'aux dernières traces d'oxygène, une bactérie lumineuse dans un bouillon de culture absorbera complètement ce gaz du moment que son affinité pour l'oxygène est plus grande.

Il en sera de même pour le bleu de Méthylène; la preuve que cela se passe ainsi est que la durée de la luminosité croît d'une manière régulière avec des doses croissantes de ce colorant qui fournira de l'oxygène en se transformant en son leucodérivé.

Faisons une série d'essais avec un bouillon lumineux au repos et ajoutons des doses croissantes de bleu de Méthylène et observons la durée de luminosité dans chaque cas.

				Durée de luminosité. Minutes.
1)	8 cm ³ de bouillon + 0,3	cm ³ Bl. de M. : + 0,9	cm ³ d'eau.	3,5
2)	8	» 0,6	» 0,6	» 6
3)	8	» 0,9	» 0,3	» 7 ³ / ₄
4)	8	» 1,2	» 0	» 9 ¹ / ₄
5)	8	» témoin	» 1,2	» 1,5

Les durées de luminosité graphiquement représentées donnent une ligne droite (Fig. I).

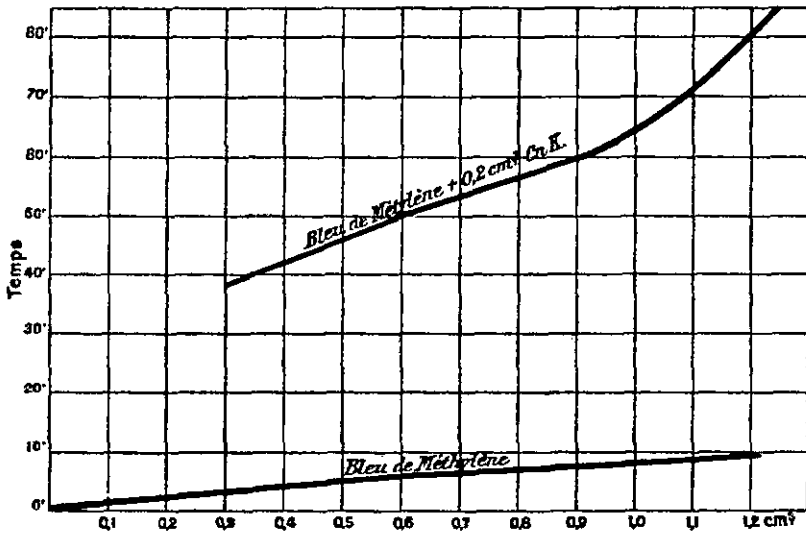


Concentration du Bleu de Méthylène.

FIG. I.

Faisons une seconde série d'essais et ajoutons à ces tubes une quantité constante de CNK, nous aurons :

							Durée de luminosité. Minutes.
1)	8 cm ³ bouillon	+ 0,3 cm ³ Bl. de M.:	+ 0,2 cm ³ CNK	+ 0,9 cm ³ H ₂ O.			38
2)	8	» 0,6	» 0,2	» 0,6	»		50
3)	8	» 0,9	» 0,2	» 0,3	»		60
4)	8	» 1,2	» 0,2	» 0	»		80



Concentration du Bleu de Méthylène.

FIG. II.

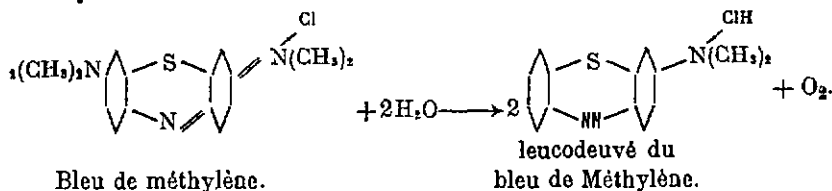
Graphiquement, nous obtenons pour ces résultats une ligne droite semblable à la première, mais déplacée d'une certaine valeur. Ce résultat est une confirmation de l'hypothèse que nous émettrons dans la suite comme quoi le CNK s'oppose à la respiration ; tout l'oxygène dans ce cas-ci servira au phénomène de la bioluminescence (Fig. II).

Le *Pseudomonas luminescens* réduit le bleu de Méthylène en son leucodérivé. Nous avons employé ce phénomène de réduction pour calculer quelle serait la quantité d'oxygène nécessaire pour provoquer la bioluminescence. La réduction se fait à l'intérieur de la bactérie qui absorbe très facilement les colorants, les réduit et laisse diffuser le leucodérivé à l'extérieur. Ce fait se constate aisément puisqu'en agitant le bouillon, devenu incolore par réduction, la coloration bleue réapparaît. *Beyerinck*¹ fait à cette occasion un parallèle entre les bactéries lumineuses et les levures. Ces dernières absorbent avidement tout l'oxygène du milieu, par contre elles ne laissent pas diffuser à l'intérieur les substances colorantes capables de fournir de l'oxygène par réduction ; aussi sont-elles incapables de les réduire. Le contraire se passe pour les bactéries lumineuses qui laissent diffuser le colorant à l'intérieur de la cellule et le réduisent.

Pour calculer l'oxygène nécessaire à la bioluminescence, nous avons procédé de la manière suivante : Un long tube de 1 cm² de section est rempli de bouillon de culture jusqu'à une petite distance de son orifice supérieur et laissé au repos jusqu'à ce que tout l'oxygène absorbé par les bactéries lors du transvasage soit brûlé. A ce moment-là, le bouillon de culture deviendra obscur ; ajoutons une quantité exactement mesurée de bleu de Méthylène et achevons de remplir le tube avec de l'eau distillée, fermons-le en prenant garde qu'il n'y ait pas de bulle d'air entre le liquide et le bouchon. Nous agitons le tube, le bleu de Méthylène en se répandant dans toutes les directions sera réduit et fournira

¹ Beyerinck. « Les bactéries lumineuses dans leur rapport avec l'O. » *Archives néerlandaises*. 23 (1889) 424.

de l'oxygène ; alors le bouillon de culture deviendra lumineux. Nous notons la durée de la luminosité et répétons l'expérience avec des quantités croissantes de bleu de Méthylène.



319 gr. de bl. de Méthylène donnent en se réduisant 16 gr. d'oxygène.

Nous avons fait une solution 0,0001 N. de bleu de Méthylène, soit 0,0319 gr. dans 1000 cm³ d'eau.

0,1 cm³ de cette solution en se réduisant donne 0,00000016 gr. d'O.

Avec un bouillon de culture âgé d'un jour, nous obtenons les résultats suivants en ajoutant des doses croissantes du bleu de Méthylène.

				Durée de luminosité. Minutes.
1)	29,2 cm ³ bouillon	+ 0,3 cm. sol. de Bl. de Méthylène N/100000	+ 0,5 cm ³ H ₂ O	3
2)	28,9	» 0,6	» 0,5	6,25
3)	28,6	» 0,9	» 0,5	8,75
4)	28,3	» 1,2	» 0,5	12
5)	28,0	» 1,5	» 0,5	14,5

La durée de luminosité croît proportionnellement avec l'augmentation du bleu de Méthylène. J'ai préféré prendre une quantité constante d'eau pour cette expérience et faire un peu varier le volume du bouillon vu que l'eau (même récemment bouillie) contient toujours de l'oxygène dissous et les causes d'erreurs n'auraient pas été négligeables.

D'après ce tableau nous pouvons admettre que 0,1 cm³ de bleu de Méthylène 0,0001 n. produit une bioluminescence durant une minute pour 28 cm³ de bouillon âgé d'un jour.

0,1 cm³ de bleu de Méthylène fournit par réduction 0,00000016 gr. O.

Si 28 cm³ de bouillon consomment 0,00000016 gr. O. en une minute, 1 cm³ en consommera 0,000000057 gr. O., ce qui est égal à 0,004 mm³.

0,004 mm³ d'O. suffisent à entretenir la luminosité durant une minute pour 1 cm³ de culture âgé d'un jour.

Si nous ajoutons à un bouillon de culture un cm³ d'une solution d'azotate de potassium à 1 %, il est possible après une demi-heure de déceler des traces de nitrite au moyen de la réaction de Gries. La réduction se faisant très lentement, on ne peut pas observer d'augmentation dans la durée de luminosité. Le sulfite de sodium est réduit jusqu'à la formation d'hydrogène sulfuré, quarante-huit heures après l'ensemencement d'un bouillon de culture contenant du sulfite de sodium un papier imprégné d'acétate de plomb se noircit. Des milieux contenant du sulfate, du thiosulfate ne donneront pas naissance à l'hydrogène sulfuré par réduction.

L'oxygène peut se trouver à l'état moléculaire et atomique, il serait intéressant de savoir si cette dernière modification allotropique peut aussi augmenter la durée de luminosité. La *peroxydase* (ferment oxydant) en présence d'eau oxygénée active ce dernier; nous nous sommes servi de cette réaction pour fournir des quantités croissantes d'oxygène actif au bouillon de bactéries lumineuses.

Nous avons fait deux séries d'essais en faisant varier tantôt les quantités d'eau oxygénée, tantôt celles de peroxydase, et avons observé pour chaque cas les durées de luminosité.

H₂O₂ et peroxydase constante.

							Durée de luminosité. Minutes.
1)	8 cm ³ bouillon	+ 0,12 cm. H ₂ O ₂	+ 0 8 cm ³ peroxydase	+ 1,08 cm. H ₂ O.			33
2)	8	» 0,2	» 0,8	» 1,00	»		41
3)	8	» 0,31	» 0,8	» 0,89	»		56
4)	8	» 0,5	» 0,8	» 0,70	»		95
5)	8	» 0,8	» 0,8	» 0,40	»		140
6)	8	» 1,28	» 0,8	» 0	»		180
7)	8	» témoin	» 0	» 2	»		12

Nous nous sommes servi d'une solution de H_2O_2 à 1,7‰, et d'une solution obtenue en dissolvant 0,1 gr. de peroxydase dans 25 gr. d'eau (Fig. III).

COURBE I

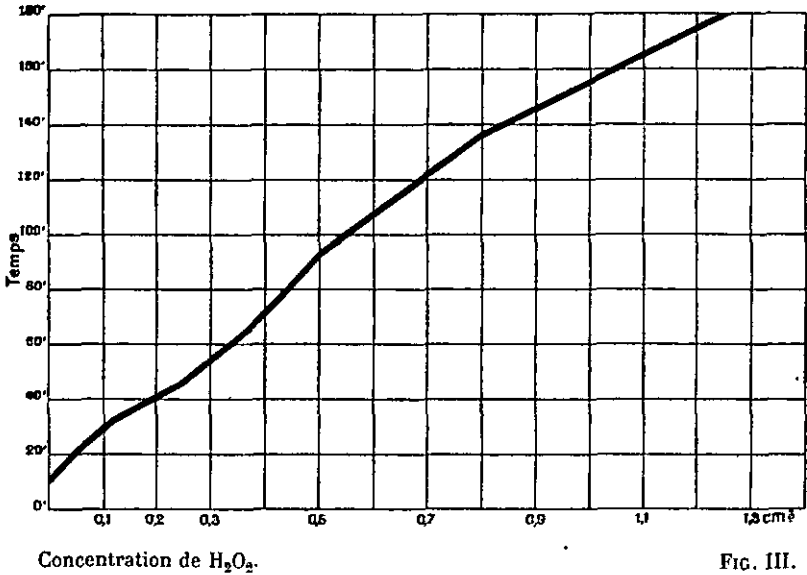


FIG. III.

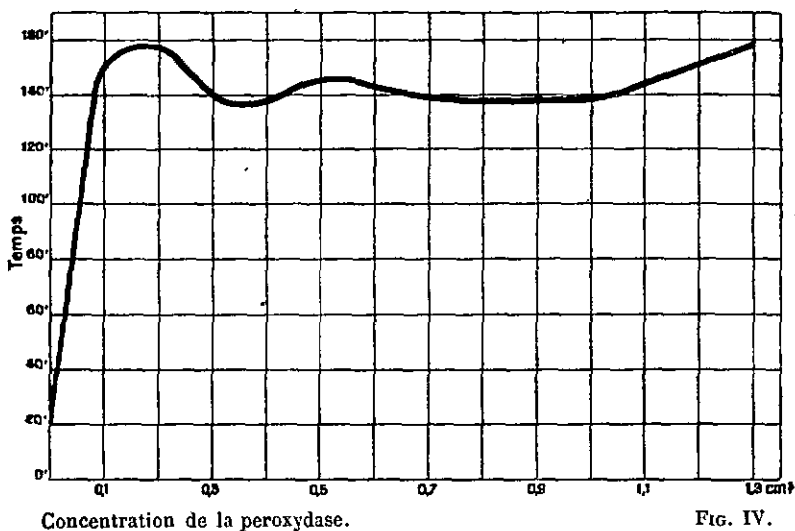
H₂O₂ constant et peroxydase variable.

						Durée de luminosité. Minutes.	
1)	8 cm ³	bouillon	+ 0,12 cm ³	peroxydase	+ 0,8 cm. H ₂ O ₂	+ 1,08 cm. H ₂ O.	155
2)	8	»	0,2	»	0,8	» 1,00	» 158
3)	8	»	0,31	»	0,8	» 0,89	» 135
4)	8	»	0,5	»	0,8	» 0,70	» 145
5)	8	»	0,8	»	0,8	» 0,40	» 138
6)	8	»	1,28	»	0,8	» 0,00	» 158
7)	8	»	témoin	»	0	» 2	» 12

Les résultats du tableau I graphiquement représentés donnent une ligne sensiblement droite, ce qui veut dire que la durée de luminosité augmente proportionnellement avec les quantités d'eau oxygénée. La peroxydase ne semble pas jouer un autre rôle que celui d'activer le peroxyde inorganique.

Les résultats du tableau II graphiquement représentés donnent une courbe s'élevant rapidement puis devenant sensiblement parallèle à l'axe des X. Les numéros 5 des tableaux

COURBE II



I et II ayant les mêmes quantités d'eau oxygénée et peroxydase ont à peu de chose près la même durée de luminosité. 0,12 cm³ de peroxydase sont bien suffisants pour activer 0,8 cm³ de H₂O₂. Ce qui est intéressant, c'est de constater que H₂O₂ et la peroxydase agissent dans un certain rapport et que lorsque ce rapport est atteint (il l'est lorsque 0,12 cm³ de peroxydase sont en présence de 0,8 cm d'eau oxygénée), une augmentation du ferment n'aura pas d'action sur la marche de la réaction.

Nous avons fait deux séries d'expériences semblables avec de la catalase et de l'eau oxygénée. L'H₂O₂ est décomposée par la catalase en eau et en oxygène moléculaire.

H₂O₂ variable et catalase constante.

						Durée de luminescence Minutes.
1)	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm. H ₂ O ₂	+ 0,8 cm. de Catalase	+ 1	cm H ₂ O.	28
2)	»	0,4	» 0,8	» 0,8	»	45
3)	»	0,8	» 0,8	» 0,4	»	82
4)	»	1,6	» 0,8	» 0	»	140
5)	»	2	» 0,8	» 0	»	140
6)	»	témoin	» 0	» 2	»	15

La concentration de H₂O₂ était de 1,7 ‰, la solution de catalase était de 0,1 gr. dans 10 gr. d'eau (Fig. V).

COURBE III

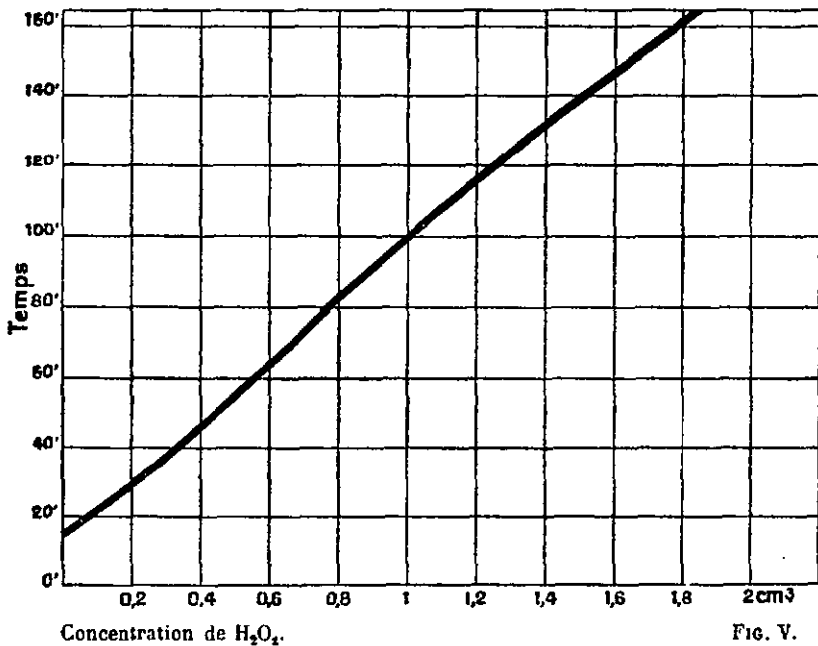


FIG. V.

H₂O₂ constante catalase variable.

						Durée de luminescence Minutes.
1)	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm. Catalase	+ 0,8 cm. H ₂ O ₂	+ 1,0 cm. H ₂ O.		80
2)	8	» 0,4	» 0,8	» 0,8	»	68
3)	8	» 0,8	» 0,8	» 0,4	»	78
4)	8	» 1,6	» 0,8	» 0	»	65
5)	8	» 2	» 0,8	» 0	»	66
6)	8	» témoin	» 0	» 2	»	15.

COURBE IV

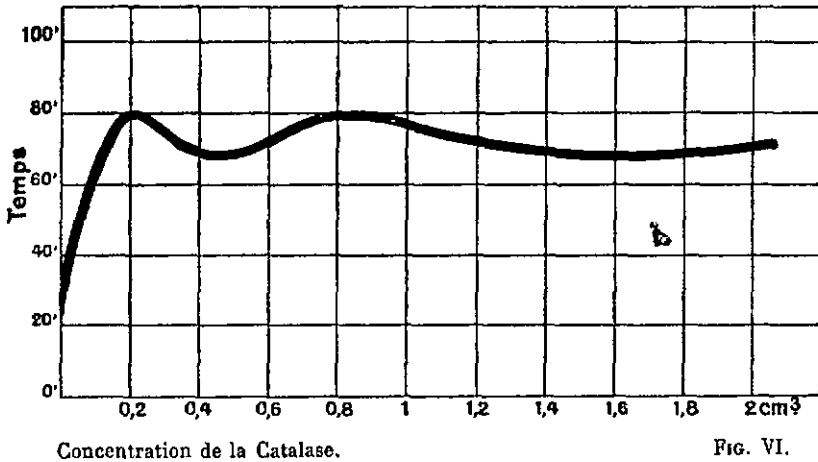


FIG. VI.

Les résultats du tableau III sont graphiquement représentés par une ligne droite, ce qui signifie que la durée de luminosité augmente proportionnellement avec la quantité d'eau oxygénée. Les résultats du tableau IV donnent une ligne qui monte rapidement puis reste sensiblement parallèle à l'axe des X. Les numéros 3 des tableaux III et IV qui ont la même quantité de catalase et d'eau oxygénée ont à peu de chose près la même durée de luminosité. La quantité de 0,2 cm³ de catalase est suffisante pour décomposer 0,8 cm³ d'eau oxygénée. Ce qui importe pour l'augmentation de la durée de luminosité, c'est l'eau oxygénée et non le ferment. C'est pourquoi nous avons obtenu une pareille courbe. On peut faire les mêmes constatations au point de vue théorique comme dans le cas où la peroxydase était variable et l'eau oxygénée constante.

L'oxygène moléculaire et actif peut activer la luminosité (courbes I et III). Les ferments ne servent qu'à décomposer l'eau oxygénée; des quantités croissantes de ceux-ci n'augmentent pas la durée de luminosité (courbes II et IV), dès que le rapport Π, O_2 — ferment est atteint.

La peroxydase ainsi que la catalase bouillies (20 minutes) ne donnèrent aucun résultat, de cette manière là est exclue l'hypothèse que ces ferments pourraient agir par des sels inorganiques qui leur seraient propres et non détruits par la chaleur. C'est bien à leur fonction ferment qu'il faut attribuer leur effet.

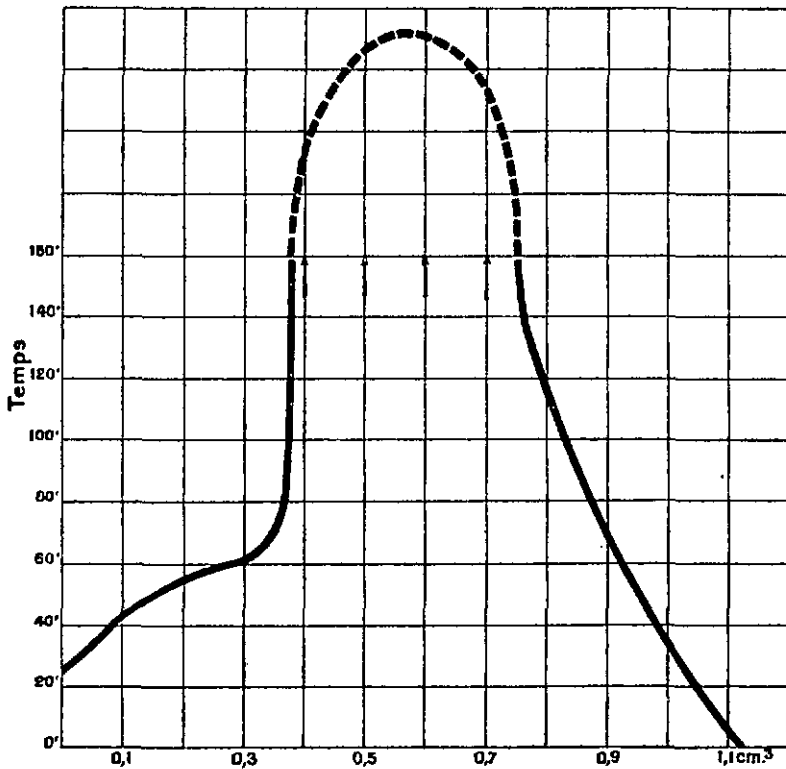
Dans la réaction peroxydase-peroxyde inorganique (H_2O_2) ce dernier peut être remplacé par un peroxyde organique, une *oxygénase*. Il se pourrait que la bactérie ait à sa disposition un pareil corps qui additionnerait O_2 et formerait un

peroxyde organique Bact $\begin{matrix} -O \\ | \\ -O \end{matrix}$. Si c'était le cas, l'eau oxygénée serait inutile et la réaction serait la même en son absence. Pour voir si c'était le cas, nous avons fait une série d'expériences avec du bouillon lumineux et des doses croissantes de peroxydase. Les durées de luminosité représentées graphiquement ne donnent pas de courbes qui puissent être comparées aux courbes des tableaux I et II, mais une courbe des plus irrégulières avec plusieurs maxima et minima, et ayant une allure accidentelle pour chaque série d'expériences.

Nous pouvons tirer de là la conclusion que la bactérie n'a pas à sa disposition une oxygénase pouvant remplacer l'eau oxygénée.

Faisons une série d'expériences en ajoutant des quantités croissantes de H_2O_2 au bouillon lumineux, et observons les durées de luminosité correspondantes.

						Durée de luminosité. Minutes.
1)	8 cm. de bouillon	+ 0,1 cm. H_2O_2	+ 1,9 cm. H_2O .			42
2)	8	» 0,2	» 1,8	»		55
3)	8	» 0,3	» 1,7	»		60
4)	8	» 0,4	» 1,6	»	>	150
5)	8	» 0,5	» 1,5	»	>	150
6)	8	» 0,6	» 1,4	»	>	150
7)	8	» 0,7	» 1,3	»	>	150
8)	8	» 0,8	» 1,2	»		120
9)	8	» 1,0	» 1,0	»		35
10)	8	» témoin	» 2	»		25



Concentration de la solution de H_2O_2 .

FIG. VII.

Les résultats donnèrent une courbe qui rappelle beaucoup celle que *Duclaux*¹ trouva lorsqu'il représentait graphiquement le développement de microorganismes en présence de doses croissantes d'antiseptiques (Fig. VII).

Tout antiseptique à très faible dose a un effet excitant sur la bactérie et se traduit chez nous par une augmentation de la durée de luminosité. Si la concentration augmente toujours il arrivera un moment où la courbe cessera de croître, ce qui signifie que la concentration a un effet optimum. Si les doses d'antiseptique continuent à augmenter, la courbe

¹ *Duclaux. Traité de Microbiologie. 3 (1900) 461.*

diminuera rapidement; on peut envisager cette dernière comme étant la résultante des deux actions : 1^o action activante, et 2^o action paralysante; dans la première partie de la courbe c'est l'action activante qui seule est représentée; à partir de l'optimum l'action paralysante influence de telle manière que la courbe au lieu de continuer à monter décroît rapidement. Le point où la courbe coupe l'axe des X indique la dose mortelle de l'antiseptique. *Duclaux* avait construit de pareilles courbes en mesurant l'action antiseptique du sublimé et du sulfate de cuivre sur la croissance de différentes levures.

Notre courbe mesurant l'augmentation de la durée de luminosité en présence de l'eau oxygénée peut se rattacher à celle trouvée par *Duclaux*. Les quantités d'eau oxygénée comprises entre 0 et 0,6 cm³ activent la luminosité, c'est à cette valeur là que correspond l'optimum, de 0,6 à 1 cm³, la courbe décroît rapidement et la dose mortelle serait entre 1,1 à 1,2 cm³ d'eau oxygénée. (La concentration de l'eau oxygénée est de 1,7 ‰.)

Il faut en tout cas exclure l'idée qui pourrait surgir que l'eau oxygénée serait décomposée par de la catalase excrétée par la bactérie et fournirait ainsi des quantités croissantes d'oxygène. Si cela avait été le cas, nous aurions obtenu une ligne droite pour les durées de luminosité, et croissant proportionnellement à la concentration de cet excitant (Courbe III).

CHAPITRE III

Substances abaissant la tension superficielle et diminuant la semipermeabilité.

Un grand nombre de corps dissous ou en fausse solution dans l'eau abaissent la tension superficielle¹. La tension superficielle du milieu de culture diminuant finira par devenir égale à la tension superficielle de la couche de protoplasme entourant la cellule microbienne. A ce moment-là, les échanges pouvant se faire entre l'extérieur et l'intérieur sont facilités.

Dans les cellules végétales, le protoplasma n'est pas collé directement à la paroi cellulaire, mais tout autour de cette membrane se trouve une condensation du protoplasma qui a pour but de s'opposer à l'entrée et à la sortie des corps dissous dans le liquide cellulaire et dans le milieu ambiant. La paroi cellulaire qui est en cellulose, laisse passer tous les corps organiques et inorganiques dissous, ou en fausse solution dans l'eau. On dira alors que cette paroi de cellulose est perméable à tous les corps. S'il n'y avait pas d'autres obstacles pour l'entrée et la sortie des corps dissous, le suc cellulaire changerait à tout moment de composition tant au point

¹ D'après Fischer. *Vorlesungen über Bakterien* (1904) 20-31.

de vue quantitatif que qualitatif selon que l'on place la plante dans une solution saline ou dans de l'eau pure.

C'est la membrane de l'ectoplasme qui est chargée de s'opposer à l'entrée et à la sortie des corps dissous et des dissolvants. Cette membrane-là est semipermeable, ce qui veut dire qu'elle ne laisse passer que certains corps dissous ou le dissolvant seul, à l'exclusion des corps qui sont dissous. Pour que la cellule soit un système osmotique, il faut qu'elle soit entourée par de l'eau ou par une solution ; les sels, tant extérieurs qu'intérieurs, cherchent à diffuser, il en résultera à l'intérieur une pression, que l'on nommera pression osmotique, qui dépend de la diffusion de ces sels, ainsi que de leur quantité, pression qui sera égale à la somme des pressions partielles des différents corps dissous.

Il en résultera que la membrane protoplasmique sera repoussée contre la paroi de cellulose qui n'a pas d'autre but que celui de soutien. Ceci a été dit pour les cellules végétales, il en est de même pour les cellules microbiennes ; cependant ces cellules sont dépourvues de vraies membranes cellulosiques.

Les bactéries peuvent être divisées en deux grands groupes :

1) bactéries très perméables aux sels, sucres et corps organiques.

2) bactéries peu perméables aux sels, sucres et corps organiques.

Nous avons vu que les sels dissous dans le suc cellulaire en vertu de leur diffusion exercent une pression qui peut facilement être trouvée et qui sera égale à la pression osmotique du milieu ambiant (pour les bactéries peu perméables) lorsque ce système est en équilibre.

Plaçons une bactérie perméable dans un milieu hypertonique, l'échange des sels et du dissolvant se fera facilement. Au microscope, nous ne remarquerons pas de changement à l'intérieur de la bactérie, il en sera de même lorsque le milieu ambiant sera hypotonique. Pour les bacté-

ries peu perméables, il se passera un phénomène différent, lorsque l'on place les cellules dans un milieu hypertonique, les sels ne pouvant diffuser, l'état d'équilibre ne serait jamais atteint si l'eau ne pouvait passer à travers la membrane de protoplasme et se répandre dans le liquide ambiant. Il en résultera pour la bactérie que son intérieur cellulaire se rétrécira et formera plusieurs amas, et non un seul, comme chez les plantes supérieures. On parlera alors de plasmolyse.

Il nous est facile de voir que l'on ne peut indifféremment transporter une bactérie d'un milieu dans un autre sans risquer de nuire à son bon fonctionnement ; dans un paragraphe précédent, nous nous posions le problème de changer la solution protectrice (3 % de chlorure de sodium) par un autre électrolyte. Il était de toute importance de choisir des quantités isotoniques des différents sels pour empêcher une plasmolyse qui se serait sans doute produite.

La semiperméabilité n'est pas une constante, mais une variable qui est fonction de l'état du protoplasme. Est-il possible de la faire varier si les conditions de vie sont différentes ; c'est le problème que nous nous sommes posé ?

Le « *Pseudomonas luminescens* » semble rentrer dans la catégorie des bactéries peu perméables, du moment qu'il ne peut vivre si la solution protectrice n'a pas une certaine pression osmotique. En faisant varier les conditions physiques du milieu de culture, nous aurons sans doute une répercussion sur la semiperméabilité du protoplasme.

On appelle tension superficielle la tendance qu'ont les liquides de s'opposer à la déformation de leurs surfaces. La tension superficielle de l'eau a été prise comme unité.

Si par différents moyens nous cherchons à abaisser cette tension dans le milieu de culture par adjonction d'alcools par exemple, nous verrons que la semiperméabilité de la membrane bactérienne sera aussi diminuée. Czapeck¹, qui

¹ Czapeck. Ueber eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jéna 1911.

étudia l'action des solutions alcooliques sur les cellules végétales, remarqua que lorsque la tension superficielle de la solution était abaissée jusqu'à une valeur de 0,6-0,7, la diminution de semiperméabilité était la plus grande et qu'à ce moment-là les échanges cellulaires étaient facilités.

*Max Krehan*¹, dans son travail *Beiträge zur Phystologie des Stoffaufnahme in die Lebende Pflanzenzelle*, remarque que les alcools, tout en diminuant la semiperméabilité faciliteraient l'exosmose des corps cellulaires. Dans notre cas, si cette manière de voir était exacte, la substance lumineuse émigrerait à l'extérieur et pourrait être séparée des bactéries en filtrant le bouillon de culture ainsi traité sur une bougie de *Chamberland*. Ceci a été fait et n'a donné aucun résultat, aussi, comme aucun corps lumineux ne sort de la cellule, il nous faut donc admettre que cette substance ne peut diffuser et qu'elle est intimement liée avec le protoplasme microbien. Par contre, l'oxygène peut facilement passer à travers la membrane et oxyder le corps lumineux.

Si cette manière de voir est exacte, la durée de la luminosité en présence d'alcools jouant le rôle d'excitants et diminuant la semiperméabilité, serait fortement augmentée.

Pour étudier l'action d'un excitant quelconque sur les bactéries, nous procédons de la manière suivante :

Une série de tubes de petit diamètre de la même grandeur sont remplis jusqu'à la même hauteur par un bouillon de bactéries lumineuses ; après un certain temps de repos, le bouillon est obscur, exception faite du ménisque supérieur qui est en contact avec l'air atmosphérique. On ajoute dans ces différents tubes des doses croissantes de la solution dont on veut mesurer l'effet sur la luminescence, et on finit de les remplir jusqu'à une certaine marque avec de l'eau pour que le volume soit partout le même. Ces tubes sont agités tous de la même façon, un peu d'oxygène se dissolva dans

¹ *Max Krehan. Beiträge zur physiologie des Stoffaufnahme in die Lebende Pflanzenzelle (1914) 239.*

le liquide, et de suite le bouillon émettra une vive luminosité. Le temps qu'il faudra à ces différents tubes pour s'éteindre sera inégal et croîtra jusqu'à une certaine concentration de l'excitant.

Connaissant pour chaque tube la dose de l'excitant ajouté et la durée de luminosité, on pourra avec ces deux données construire une courbe. C'est le moyen que nous avons toujours employé pour étudier l'effet d'un excitant, c'est la méthode la plus facilement applicable dans tous les cas.

Nous avons pensé mesurer l'intensité lumineuse pour chaque essai, mais celle-ci varie peu, elle est trop faible pour que le photomètre de *Foucault* nous donne des résultats exacts; d'autre part, elle est de trop faible durée pour être mesurée par la décomposition du chlorure d'argent.

Influence de CH_3OH sur le bouillon de bactéries lumineuses.

Prenons une série de tubes remplis de bouillon lumineux et ajoutons des doses croissantes de cet alcool et notons la durée de luminosité pour chaque tube.

	Durée de luminosité. Minutes.				
I. 8 cm ³ de bouillon	+ 0,1 cm ³ CH_3OH	+ 1,9 cm ³ H_2O .			2
II. 8	» 0,4	» 1,6	»		3
III. 8	» 0,6	» 1,4	»		2,5
IV. 8	» 0,8	» 1,2	»		2
V. 8	» 1	» 1	»		2,5
VI. 8	» 1,3	» 0,7	»		11
VII. 8	» 1,5	» 0,5	»		50
VIII. 8	» 1,7	» 0,3	»		15
IX. 8	» 2	» 0	»		0
X. 8	» témoin	» 2	»		2

La concentration de l'alcool méthylique était 66, 88 % vol. (Fig. VIII).

L'intensité lumineuse n'a pas été la même dans tous les tubes, le tube témoin (X) est le plus lumineux, dans les autres tubes l'intensité était très faible au commencement,

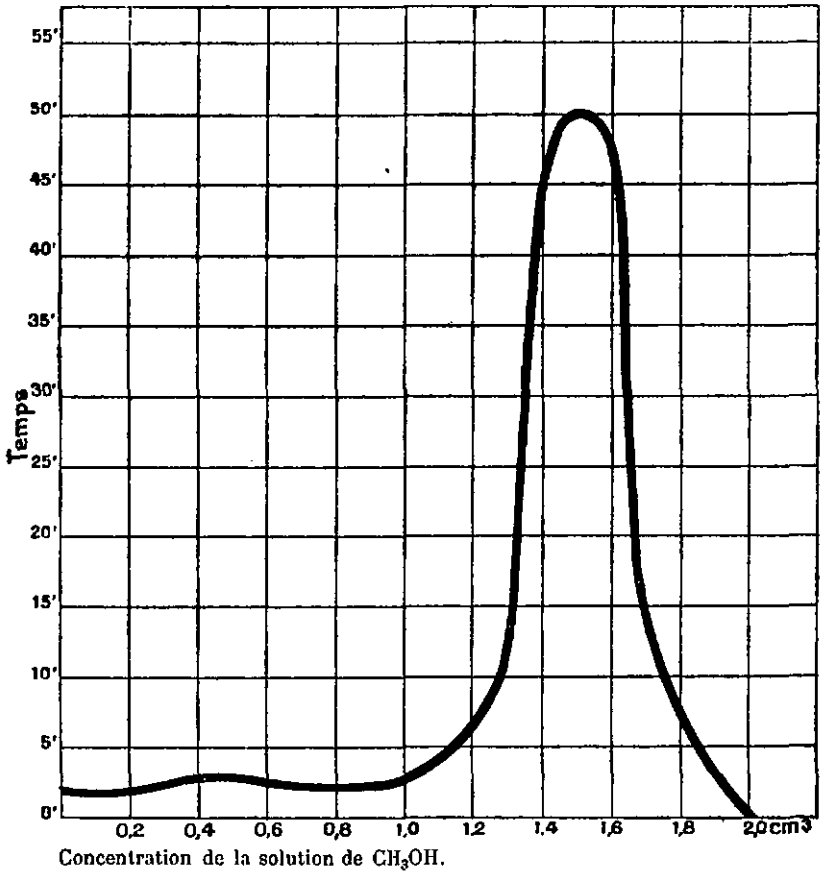


FIG. VIII.

puis augmentait un peu, restait constante durant un moment et s'éteignait lentement à partir du fond.

Tous ces tubes ayant été agités de la même manière, ils contiendront la même quantité d'oxygène dissous. Si la luminescence dure plus longtemps dans le tube VII, que dans le tube X, cela est dû en grande partie à une répartition différente de l'oxygène. L'alcool ayant diminué la semi-perméabilité de la membrane cellulaire, l'oxygène pourra plus facilement diffuser à l'intérieur, et vu son affinité pour

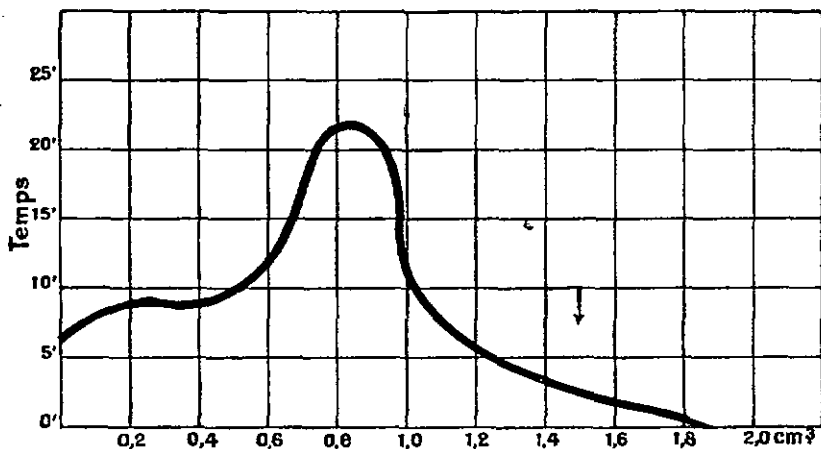
la substance lumineuse, il sera de suite lié pour la fonction photogénique, tandis qu'une partie infime de ce gaz servira à la respiration.

Influence de C_2H_5OH sur le bouillon de bactéries lumineuses.

Série d'essais analogues aux précédents, mais contenant de l'alcool éthylique comme excitant (Fig. IX).

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,1 cm ³ C_2H_5OH	+ 1,9 cm ³ H_2O .		8
II.	8	» 0,2	» 1,8	»	9
III.	8	» 0,4	» 1,6	»	9
IV.	8	» 0,6	» 1,4	»	12
V.	8	» 0,8	» 1,2	»	21
VI.	8	» 1	» 1	»	< 11
VII.	8	» 1,5	» 0,5	»	< 10
VIII.	8	» 2	» 0	»	0
IX.	8	» témoin	» 2	»	7

La concentration de la solution alcoolique ajoutée était de 77,46 % vol.



Concentration de la solution de C_2H_5OH .

FIG. IX.

Les courbes obtenues en employant ces deux alcools sont sensiblement les mêmes; l'optimum pour l'alcool méthylique est plus prononcé que pour l'alcool éthylique.

*Traube*¹ qui étudia l'action des différents alcools sur l'abaissement de la tension superficielle, trouva que pour un même poids des différents alcools gras, l'abaissement de la tension superficielle est proportionnelle au poids moléculaire de ces alcools. *Richardson*² trouva de même que la toxicité des alcools gras augmentait rapidement avec le nombre des atomes de carbone.

*Czapeck*³, en étudiant l'action des différentes solutions alcooliques sur les cellules végétales, remarqua que l'exosmose se faisait toujours lorsque la tension superficielle du milieu atteignait la valeur de 0,7-0,6 (1 étant la tension superficielle de l'eau), peu importe avec quel alcool de la série grasse cet abaissement était obtenu. Il admettait que la tension superficielle du liquide était devenue égale à celle de la couche de protoplasme qui entoure la cellule et qu'à ce moment-là le tanin contenu dans les cellules végétales pouvait sortir. Pour cet auteur, l'exosmose se produisait pour deux solutions équimoléculaires de CH_3OH et $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ lorsque le rapport des concentrations de vol. était $\frac{18}{11}$.

Le rapport sera dans notre cas $\frac{10}{6,2}$ (10 % vol. étant la con. de l'alcool méthylique dans le tube ayant la durée de luminosité maximale et 6,2 % vol. étant la con. de l'alcool éthylique dans le tube ayant aussi la durée de luminosité maximale). Notre rapport est sensiblement le même que celui que trouva *Czapeck*. Nous voyons que la loi de *Traube* se vérifie et que la théorie de *Czapeck* nous indique qu'il y a

¹ Traube. *Ueber die Kapillaritäts Konstanten Organ: Stoffe in wasseringen Lösungen Liebigs Annalen.* 265 (1891) 27.

² B.-W. Richardson. « Physiolog. Rescherch on alcools. » *Med. Times and Gaz.* 3 (1869).

³ Czapeck. *Ueber eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenpannung der Plasmahant von Pflanzenzellen.* Jéna 1911.

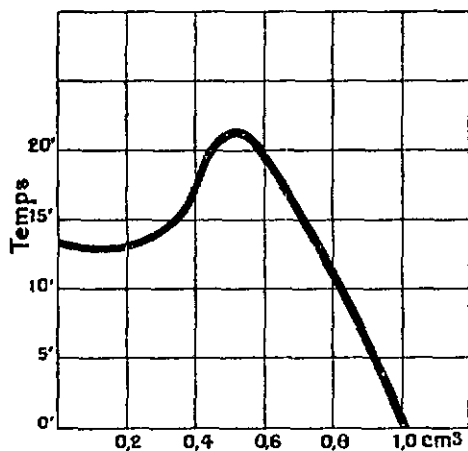
un rapport entre ces deux alcools, et que pour obtenir le même résultat, il faudra de plus grandes concentrations de l'alcool méthylique que de l'alcool éthylique.

Le fait intéressant pour nous est que lorsque la diminution de semiperméabilité a atteint une certaine valeur (la même dans les deux cas), la durée de luminosité est maximale, et que le rapport indiqué par *Czapeck* au sujet de la concentration de ces deux alcools et celui que nous avons trouvé sont à peu de chose près égaux.

Il est à remarquer que l'optimum avec l'alcool méthylique est plus prononcé qu'avec l'alcool éthylique, il y aurait donc aussi une action qualitative.

Influence de l'éther sur le bouillon de bactéries lumineuses.

Non seulement les alcools abaissent la tension superficielle des liquides mais aussi l'éther, le chloroforme, les esters, les cétones, la glycérine, etc. De tous ces corps, nous avons choisi l'éther et avons fait une série d'expériences analogues à celles faites avec les alcools (Fig. X).



Concentration de la solution d'éther.

FIG. X.

				Durée luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,4 cm ³ eau saturée d'éther	+ 1 cm ³ H ₂ O.	13
II.	8	» 0,2	» 0,8	13
III.	8	» 0,4	» 0,6	17
IV.	8	» 0,6	» 0,4	19
V.	8	» 0,8	» 0,2	12
VI.	8	» 1	» 0	0
VII.	8	» témoin	» 1	13

Le maximum pour la durée de luminosité se trouve lorsque l'on ajoute 0,6 cm³ de solution d'éther; il faut donc admettre que la diminution de semiperméabilité sera la même que dans les cas précédents où l'on ajoutait 1,5 cm³ d'alcool méthylique ou 0,8 cm³ d'alcool éthylique (1 gr. H₂O dissout 0,0839 gr. d'éther).

Ces différentes séries d'essais ont été faites avec des bouillons âgés de 1 à 3 trois jours. On pourrait croire que les résultats obtenus seraient les mêmes indépendamment de l'âge de la culture. Ce n'est pas le cas. Nous avons fait plusieurs séries d'expériences pour étudier l'action de l'alcool méthylique sur des bouillons de cultures âgés de 3, 7 et 11 jours.

				Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,8 cm ³ H ₂ O.	18
II.	8	» 0,5	» 1,5	22
III.	8	» 0,75	» 1,25	24
IV.	8	» 1	» 1	25
V.	8	» 1,3	» 0,7	40
VI.	8	» 1,5	» 0,5	44
VII.	8	» 1,75	» 0,25	36
VIII.	8	» 2	» 0	0
IX.	8	» témoin	» 2	14

Ce bouillon là était âgé de 3 jours.

				Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,8 cm ³ H ₂ O.	52
II.	8	» 0,3	» 1,7	57
III.	8	» 0,5	» 1,5	68
IV.	8	» 0,6	» 1,4	69
V.	8	» 0,85	» 1,15	92
VI.	8	» 1	» 1	155
VII.	8	» 1,1	» 0,9	102
VIII.	8	» 1,6	» 0,4	0
IX.	8	» témoin	» 2	53

Ce bouillon était âgé de 7 jours.

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,3 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,7 cm ³ H ₂ O.		120
II.	8	» 0,5	» 1,5	»	> 120
III.	8	» 0,7	» 1,3	»	> 120
IV.	8	» 0,8	» 1,2	»	240
V.	8	» 0,9	» 1,1	»	140
VI.	8	» 1	» 1	»	100
VII.	8	» 1,1	» 0,9	»	< 120
VIII.	8	» 1,3	» 0,7	»	0
IX.	8	» témoin	» 2	»	70

Ce bouillon était âgé de 11 jours.

En regardant ces trois courbes nous remarquons que plus la culture est âgée plus sa sensibilité vis-à-vis des excitants est grande. La dose mortelle diminue avec l'âge, tandis que l'optimum pour les durées de luminosité croit (Fig. XI).

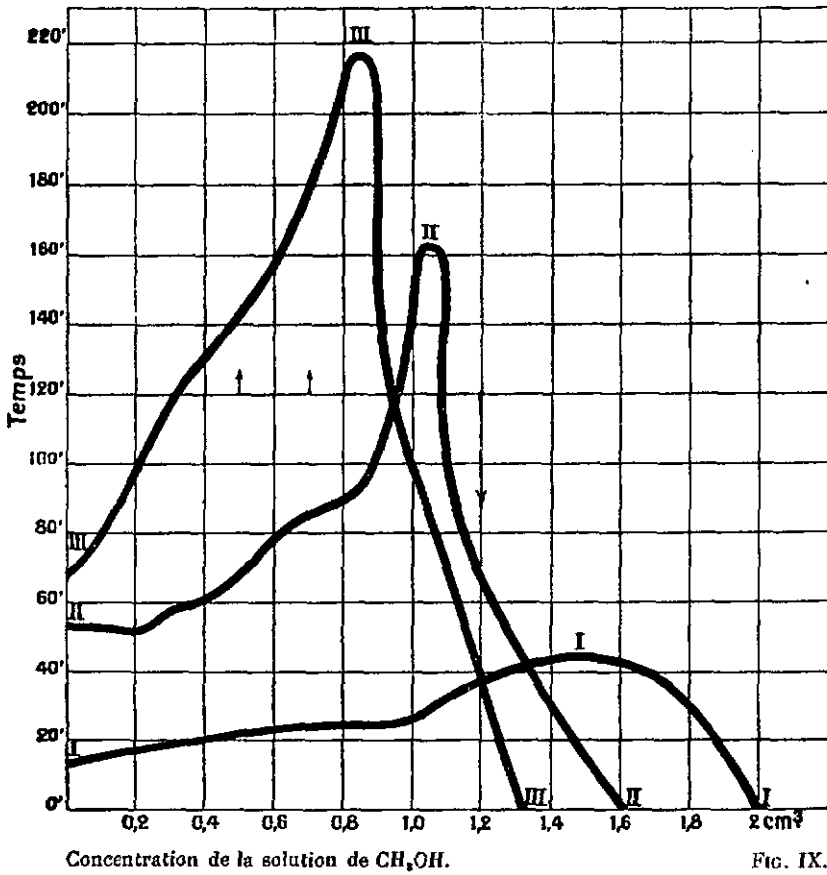


FIG. IX.

CHAPITRE IV

Action du cyanure de potassium sur la semiperméabilité.

Claude Bernard, en 1857, avait constaté une action spécifique du cyanure de potassium sur l'organisme des êtres vivants, il attribuait cela à une asphyxie, ce corps empêchant l'échange des gaz dans la respiration — l'oxygène de se transformer en acide carbonique.

C'est au professeur *Schroeder*¹, de Zurich, que revint le mérite d'avoir pu vérifier expérimentalement cette action du cyanure de potassium sur les cellules végétales. Il ne faut pas envisager cela comme une intoxication de la cellule, d'où résulterait la mort, mais seulement comme un ralentissement de la vie vu que toute oxydation est impossible. La preuve en est que *Jost*² a pu facilement observer une plante en germination durant une semaine et plus sans oxygène, sans que pour cela elle périclisse.

*Max Krehan*³ traita des cellules végétales par des solutions

¹ H. Schroeder. « Ueber den Einfluss des CNK auf die Atmung von *Aspergillus niger*, nebst Bemerkungen zur Mechanik der CNK Wirkung. » *Jahrbuch der Botanik*. (1897) 401-481.

² Jost. *Vorlesung über Pflanzenphysiologie* (1908) 329.

³ Max Krehan. *Beiträge zur physiologie der Stoffaufnahme in die lebende Pflanzenzelle*. Leipzig (1914) 207.

de concentrations très croissantes de cyanure de potassium. Il remarqua que la plasmolyse avait seulement lieu dans une solution plus concentrée pour ces cellules ainsi traitées que pour celles qui n'avaient pas été en présence de cyanure de potassium. Il expliquait cela par une augmentation (page 207) de la semiperméabilité de la membrane cellulaire provoquée par CNK. Il en résulte donc que l'endosmose se fera plus aisément en présence de ce sel.

Lorsque nous agitons exactement de la même manière des tubes contenant un bouillon de culture, une même quantité d'oxygène sera dissoute chaque fois. Ce gaz sert à deux fonctions différentes : 1° à la respiration de la bactérie et 2° à l'oxydation de la substance lumineuse. Il s'agirait pour nous d'entraver la respiration, c'est-à-dire l'oxygène de se transformer en acide carbonique, pour que tout l'oxygène puisse être employé à l'oxydation de la substance lumineuse. Ce but peut être atteint si on traite le bouillon de culture par du cyanure de potassium, car comme nous l'avons dit plus haut, il s'opposera à l'échange des gaz dans le phénomène de la respiration, en même temps la semiperméabilité sera augmentée, ce qui permettra à l'oxygène de pénétrer à l'intérieur et de se combiner avec le corps photogène.

Loeb ¹ remarqua que si l'on mettait des œufs d'oursins fécondés dans de l'eau privée d'oxygène, il en résultait que la croissance était arrêtée, il en est de même si l'on ajoute des traces de cyanure de potassium, qui empêche toute oxydation, dans de l'eau de mer bien aérée.

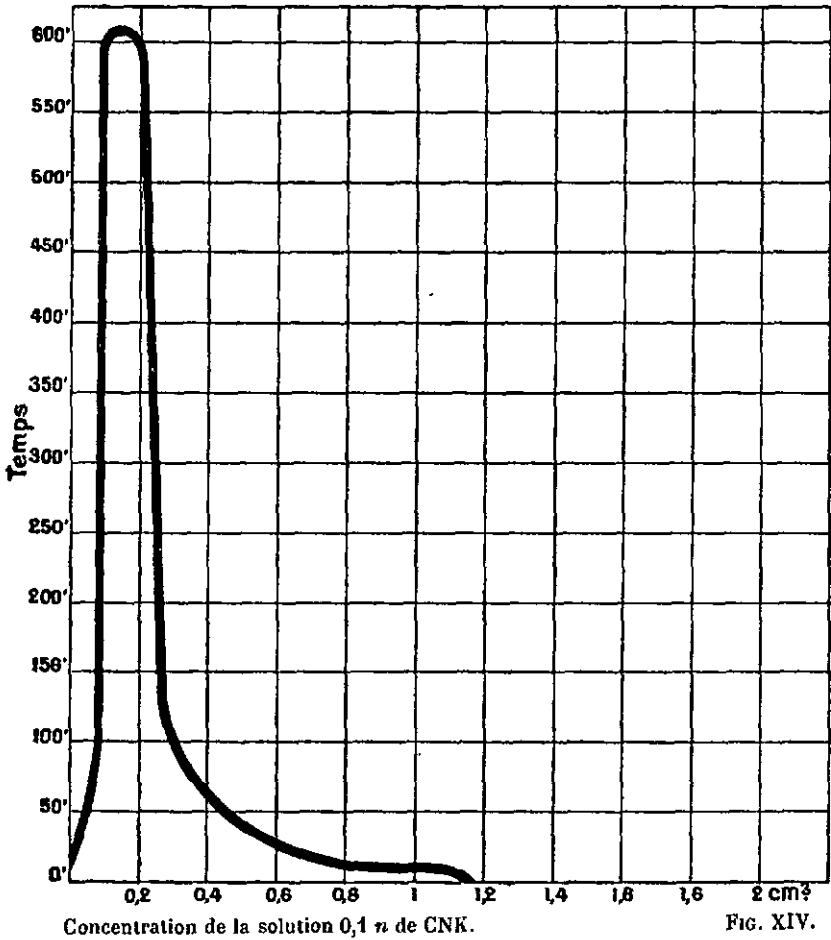
Le même auteur trouva que les œufs d'oursins pouvaient supporter une solution hypertonique en présence de cyanure de potassium, vu que ce dernier influençait la semiperméabilité.

Si cette manière de voir est exacte, les tubes contenant du cyanure de potassium auront une plus grande luminosité que les témoins. Nous avons préparé une série de tubes

¹ Jacques Loeb. *Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies*. Berlin 1909.

comme pour les essais avec les alcools, mais cette fois-ci nous ajouterons des quantités croissantes de cyanure de potassium 0,1 n (Fig. XII).

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,1 cm ³ CNK	+ 1,9 cm ³ H ₂ O.		> 590
II.	8	» 0,2	» 1,8	»	570
III.	8	» 0,4	» 1,6	»	70
IV.	8	» 0,8	» 1,2	»	> 32
V.	8	» 1,0	» 1,0	»	< 32
VI.	8	» 2,0	» 0	»	0
VII.	8	» témoin	» 2	»	6



Nous voyons donc que la luminosité augmente énormément en présence du cyanure de potassium ; on ne peut attribuer cela à une diminution de la tension superficielle comme lors de l'expérience avec les alcools, car les quantités ajoutées de cyanure de potassium sont très faibles et l'optimum se trouve déjà atteint pour une quantité de 0,1 CNK 0,1 n. La dilution de ce sel dans le bouillon de culture sera de 0,001 n. Le fait qu'il augmente la semiperméabilité avec une dilution si faible est une preuve que ce sont les ions du cyanure de potassium qui agissent et qu'en tous les cas une précipitation est exclue (*Max Krehan*)¹.

Le radical cyanogène pourrait-il se lier à la matière photogène et deviendrait-il de cette manière un groupe lucigène, (*Kaufmann*) qui aurait la facilité d'augmenter la durée et l'éclat de la luminosité ?²

Il serait normal de penser que l'intensité de la luminosité est inversement proportionnelle à sa durée. Ce n'est pas exactement le cas, le tube témoin (6 minutes) est plus lumineux que les tubes contenant 0,1 et 0,2 cm³ de cyanure de potassium. Ceux-ci sont au début très peu lumineux, seul un œil exercé peut les voir, mais après un certain temps cette luminosité augmente et atteint à peu de chose près l'intensité du témoin et reste ainsi durant plusieurs heures, puis l'obscurité se fait très lentement en commençant par le bas. On peut admettre que durant les premiers instants, le cyanure de potassium aurait un effet paralysant sous la bactérie, ensuite il y aurait un phénomène d'accoutumance.

Nous avons fait plusieurs séries d'essais et toujours obtenu une courbe pour la durée de luminosité analogue à celle-ci.

Une partie de l'oxygène de dioxyde de carbone fournie à un bouillon liquide se transformera par la respiration en acide carbonique. Si nous ajoutons des doses croissantes de

¹ Max Krehan. *Beiträge zur physiologie der Stoffaufnahme in die lebende Pflanzenzelle*. Leipzig (1914) 207.

² Guichard. « Les phénomènes de la luminescence et leurs causes. » *Revue générale des sciences*. 16 (1905) 683.

ce gaz, elles agiront de manière à empêcher le dioxyde de carbone de se produire vu que le liquide tendra à être saturé par ce gaz.

Faisons une série d'expériences, nous ajouterons aux différents tubes des doses croissantes de solution saturée d'acide carbonique (un vol. d'eau dissout 1,022 vol. de CO_2 à 15°) (Fig. XIII).

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	7 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ sol. de CO_2	+ 2,8 cm ³ H_2O .		42
II.	7	»	0,6	»	52
III.	7	»	0,9	»	58
IV.	7	»	1,3	»	60
V.	7	»	1,6	»	75
VI.	7	»	2	»	75
VII.	7	»	2,5	»	85
VIII.	7	»	3	»	95
IX.	7	»	témoin	»	42

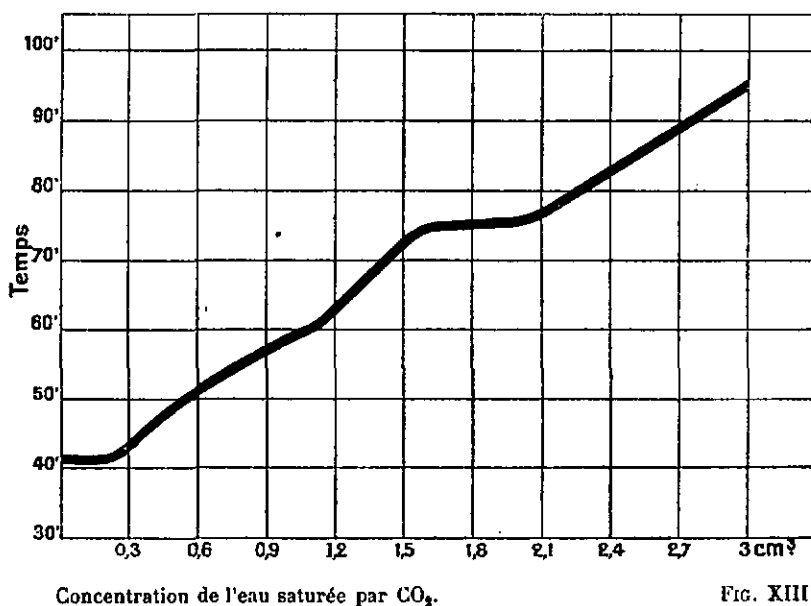


FIG. XIII.

Pour les durées de luminosité, nous obtenons une ligne droite, la durée est donc proportionnelle à la concentration

de l'acide carbonique. Nous pouvons admettre que l'oxygène aura en grande partie servi à la luminescence et que la respiration a été entravée par les doses croissantes d'anhydride carbonique. Si cette interprétation est exacte, il est probable que lors de l'oxydation du corps photogène, il ne se dégagera pas de gaz carbonique du moment que ce gaz a un effet excitant sur la luminescence.

Le monoxyde de carbone.

Le monoxyde de carbone produit une asphyxie chez les êtres vivants possédant de l'hémoglobine en formant du carboxyhémoglobine non dissociable. Dans le règne végétal, ce gaz a aussi un effet toxique, il ralentit la croissance des plantes (*Czapeck*¹). *Linossier* trouva que la croissance des graines est arrêtée lorsque celles-ci sont dans une atmosphère contenant 50 % de vol. de monoxyde de carbone. D'une manière générale le monoxyde de carbone ralentit l'évolution des végétaux en s'opposant à la respiration.

Nous avons fait une série d'essais en ajoutant des quantités croissantes d'eau saturée par du monoxyde de carbone (solubilité de 2,5 % vol.) (Fig. XIV).

					Durée de luminesc. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,25 cm ³ de sol. CO	+ 1,75 cm ³ H ₂ O		13
II.	8	»	0,5	»	15,50
III.	8	»	0,75	»	20
IV.	8	»	1	»	23
V.	8	»	1,25	»	23
VI.	8	»	1,5	»	26
VII.	8	»	1,75	»	28
VIII.	8	»	2	»	32
IX.	8	»	témoin	»	9

Ce résultat reproduit graphiquement donne une ligne droite qui s'élève proportionnellement avec les doses crois-

¹ Czapeck. *Biochemie der Pflanzen*. Jena 2 (1905) 918.

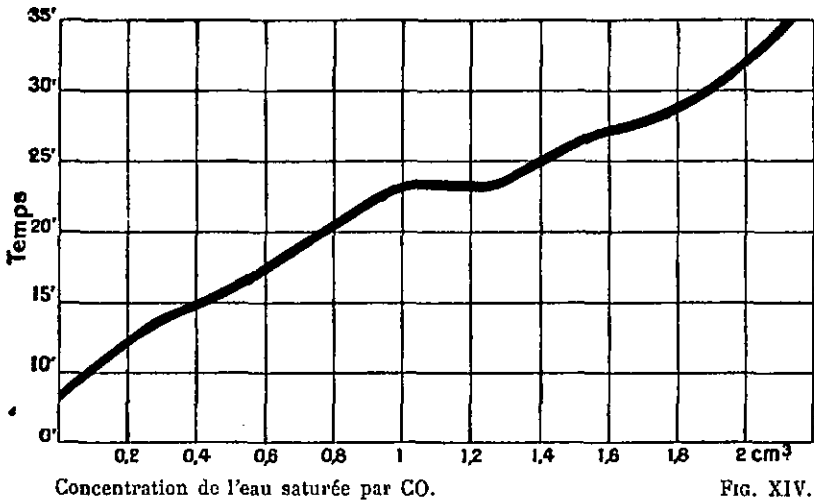


FIG. XIV.

santes de monoxyde de carbone, ce gaz s'opposant à la respiration, l'oxygène sera employé pour la bioluminescence.

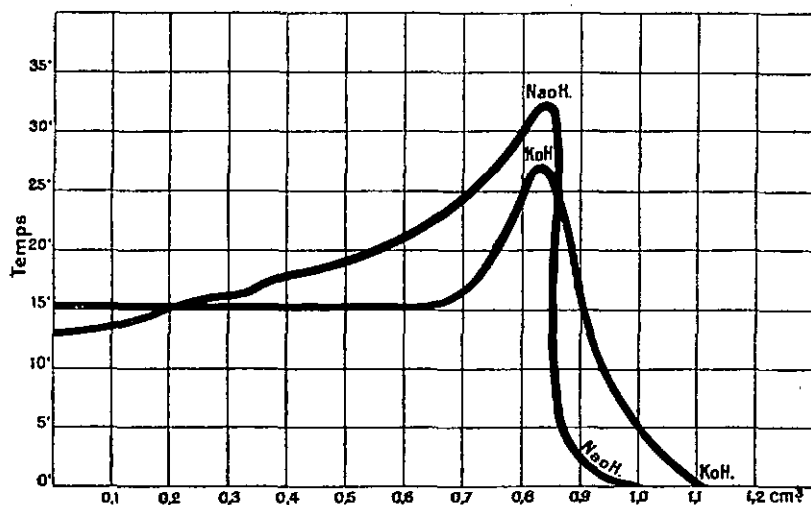
Le cyanure de potassium étant le sel d'une base forte et d'un acide faible, sera fortement hydrolysé, il a une réaction basique. Devons-nous attribuer les effets du cyanure de potassium dans les expériences précédentes au complexe CN ou au OH mis en liberté par l'hydrolyse de ce sel ? Si c'est le cas, toute base contenant le même nombre de OH aura le même effet (*Krehan*) que CNK.

Faisons une série d'essais en ajoutant des quantités croissantes de soude caustique 0,1 n (Fig. XV).

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ de NaOH	+ 1,3 cm ³ H ₂ O		15
II.	8	» 0,4	» 1,6	»	18
III.	8	» 0,5	» 1,5	»	19
IV.	8	» 0,6	» 1,4	»	21
V.	8	» 0,8	» 1,2	»	30
VI.	8	» 0,9	» 1,1	»	2
VII.	8	» 1	» 1	»	0
VIII.	8	» témoin	» 2	»	15

Série d'expériences identiques avec la potasse caustique.

					Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon + 0,2 cm ³ de KOH + 1,8 cm ³ H ₂ O.				15
II.	8	»	0,5	»	1,5
III.	8	»	0,6	»	1,4
IV.	8	»	0,7	»	1,3
V.	8	»	0,8	»	1,2
VI.	8	»	0,9	»	1,1
VII.	8	»	1	»	très faible.
VIII.	8	»	1,1	»	0
IX.	8	»	témoin	»	2



Concentration des solutions 0,1 n de base.

FIG. XV.

La soude de même que la potasse caustique augmentent la durée de la luminosité. Elles agissent donc aussi sur la semi-perméabilité. L'optimum avec le cyanure de potassium (0,1 cm³ 0,1N) correspondait à plus de 590/6 minutes, tandis que l'optimum est pour la soude caustique à 30'/15' avec une quantité de 0,8 cm³ 0,1 n ; pour la potasse caustique à 24'/13' avec 0,8 cm³ de 0,1 n.

L'augmentation de la durée de luminosité est environ cinquante fois plus grande en présence du cyanure de potassium ;

il nous faut donc attribuer cela aux ions CN. L'optimum pour le cyanure de potassium a lieu lorsqu'on ajoute $0,1 \text{ cm}^3$, pour les bases l'optimum correspondra à une quantité huit fois plus forte. Si nous devons attribuer aux ions OH cette augmentation de la semiperméabilité, l'optimum aurait lieu pour des concentrations égales de ces trois corps, si nous admettons que pour des solutions équimoléculaires il y ait le même nombre de OH (ce qui est peu probable).

C'est le radical cyanogène qui agit sur la membrane pour augmenter la semiperméabilité. OH de son côté en fera de même. Pour le cyanure de potassium, on peut négliger cette dernière action vu qu'elle est très faible par rapport à la première.

Carbonates de sodium et de potassium.

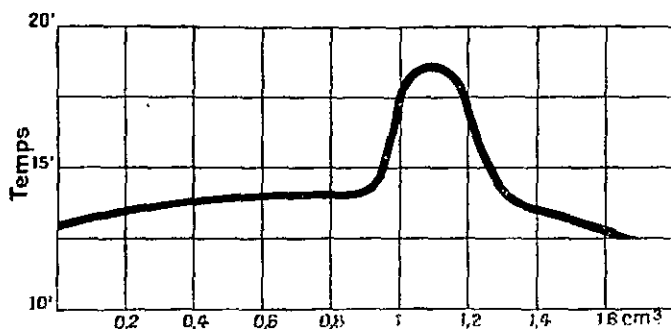
Les bases ayant une influence sur la semiperméabilité, influence qu'il faut attribuer aux OH, il est probable que les carbonates correspondant auront une action analogue.

Les carbonates alcalins donnent avec de l'eau des solutions alcalines, partiellement hydrolysées. H_2CO_3 est peu ionisé, par contre ses sels alcalins le sont très fortement. Dans ces solutions, il se trouve des ions CO_3 qui doivent se combiner avec des H pour établir l'équilibre entre H_2CO_3 et ses ions. De cette manière, il y aura des ions OH libres qui, partiellement, se combineront avec Na.

Pour des solutions équimoléculaires, le nombre des ions libres sera plus grand dans une sol. de KOH que dans une sol. de K_2CO_3 . Il est aussi à prévoir que pour des quantités égales de ces deux électrolytes l'effet produit par la potasse caustique sur l'augmentation de la semiperméabilité sera plus grand que par le carbonate de potassium.

Faisons une série d'essais en ajoutant des quantités croissantes de carbonate de potassium $0,1 \text{ n}$ (Fig. XVI).

I.	8 cm ³ de bouillon + 0,5 cm ³ K ₂ CO ₃ + 1,5 cm ³ H ₂ O.	14
II.	8 » 0,6 » 1,4 »	14
III.	8 » 0,7 » 1,3 »	14
IV.	8 » 0,8 » 1,2 »	14
V.	8 » 0,9 » 1,1 »	14
VI.	8 » 1 » 1 »	17
VII.	8 » 1,2 » 0,8 »	17
VIII.	8 » 1,3 » 0,7 »	14
IX.	8 » 1,5 » 0,5 »	13
X.	8 » témoin » 2 »	13



Concentration de la solution 0,1 n K₂CO₃.

FIG. XVI.

L'augmentation de la durée de la luminosité est très faible.

Le cyanure de potassium est aussi le sel d'un acide faible et d'une base forte. Il sera donc hydrolysé de la même manière que le carbonate de potassium. Des solutions équimoléculaires de ces deux sels contiendront approximativement le même nombre de OH. Nous voyons de cette manière quelle serait la courbe de la durée de luminosité si dans le cyanure de potassium il fallait attribuer aux ions OH l'augmentation de la semipermeabilité. Il en ressort donc que c'est bien au radical cyanogène qu'il faut attribuer cette augmentation de la durée de luminosité.

Nous avons fait une série d'essais avec le carbonate de sodium comme excitant, et obtenu des résultats semblables à ceux de l'expérience précédente. Graphiquement, la courbe a beaucoup d'analogie avec celle du carbonate de potassium.

Action des acides.

*Krehan*¹, dans son travail sur l'augmentation de la semi-perméabilité en présence du cyanure de potassium, désignait par C la concentration d'un sel dans une solution qu'une cellule végétale pouvait supporter avant d'être plasmolysée. S'il traitait auparavant cette même cellule par une solution de cyanure de potassium qui augmentait la semipermeabilité et permettait aux sels de diffuser plus facilement, il trouvait que cette même cellule n'était plus plasmolysée par une solution ayant une concentration de C, mais par une plus forte concentration qu'il désignait par C'. (C'—C) est une valeur positive.

Ce même auteur remplaçait la solution de cyanure de potassium par une solution de 0,0002 n d'acide chlorhydrique. La valeur de (C'—C) au lieu de devenir égale à 0 comme on pourrait le croire prend une valeur plus faible que dans le cas de CNK. Si dans un essai on ajoute de l'acide chlorhydrique au cyanure de potassium, la valeur (C'—C) sera égale à la somme des valeurs trouvées séparément pour ces deux corps. Nous basant là-dessus, nous avons fait trois différentes séries d'essais avec de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique et oxalique comme excitants et avons observé dans chacun les durées de luminosité (Fig. XVII).

Action de l'acide sulfurique comme excitant.

					Durée de luminosité.
					Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ SO ₄ H ₂	0,4 n	+ 1,95 cm ³ H ₂ O	13
II.	8	»	0,1	»	13
III.	8	»	0,2	»	15
IV.	8	»	0,3	»	25
V.	8	»	0,4	»	32
VI.	8	»	0,45	»	33
VII.	8	»	0,5	»	24
VIII.	8	»	0,7	»	0
IX.	8	»	témoin	»	12

¹ Krehan. *Beiträge zur Physiologie*, etc. (1914) 233.

Action de l'acide chlorhydrique comme excitant.

				Durée de luminosité. Minutes.	
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ CLH	0,1 n + 1,8 cm ³ H ₂ O.	20	
II.	8	»	0,3 »	1,7 »	34
III.	8	»	0,4 »	1,6 »	56
IV.	8	»	0,5 »	1,5 »	50
V.	8	»	0,7 »	1,3 »	0
VI.	8	»	témoin »	2 »	12

Action de l'acide oxalique comme excitant.

				Durée de luminosité. Minutes.	
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ (COOH) ₂	0,1 n + 1,8 cm ³ H ₂ O	24	
II.	8	»	0,3 »	1,7 »	32
III.	8	»	0,45 »	1,55 »	> 40
IV.	8	»	0,5 »	1,5 »	> 42
V.	8	»	0,6 »	1,4 »	0
VI.	8	»	témoin »	2 »	12

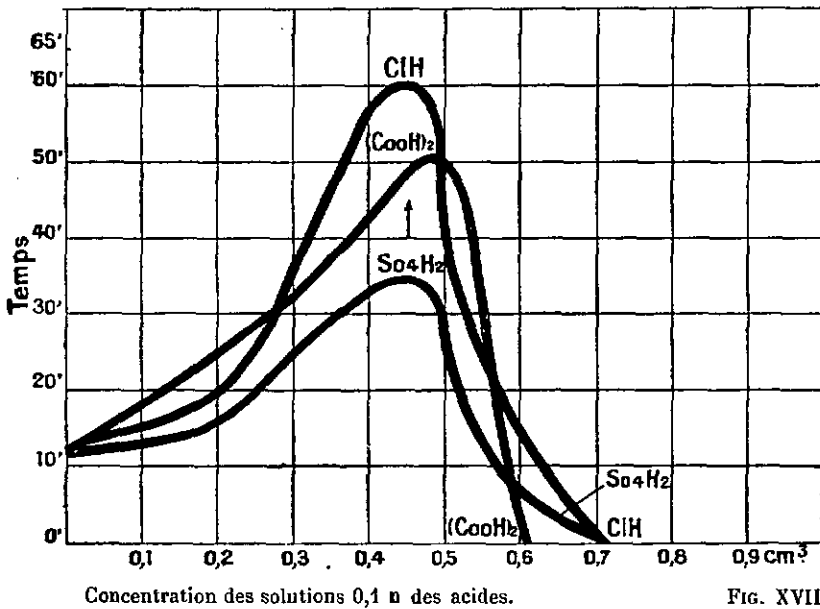


FIG. XVII.

Le *Pseudomonas luminescens* est particulièrement sensible à l'effet des acides. La quantité de 0,6 cm³ d'acide oxali-

que 0,1 n ajoutée à 10 cm³ de bouillon est déjà une dose mortelle. Les H₂ ont donc la possibilité d'augmenter la semipermeabilité, ce qui se traduit chez nous par une augmentation de la durée de la luminosité; cette augmentation semble être plus grande pour les H⁺ que pour les OH⁻.

L'optimum pour la soude caustique correspondait à trente minutes avec une quantité de 0,8 cm³ et pour l'acide chlorhydrique à cinquante-six minutes avec 0,4 cm³.

Les trois acides ne donnent pas les mêmes résultats; faut-il attribuer cela à leurs différents degrés de dissociation? Il semble que ce n'est pas le cas, car l'acide sulfurique est plus dissocié que l'acide oxalique.

L'acide oxalique a une action spécifique, semble-t-il.

Action antagoniste de CNK et de CH₃OH.

Ces deux corps ont un même effet sur les cultures du *Pseudomonas*. Au premier abord, les deux augmentent la durée de luminosité; le cyanure de potassium en très petite proportion a déjà un grand effet, il empêche l'échange des gaz à l'intérieur de la cellule. Il s'oppose à la formation de corps à grands poids moléculaires, qui résulteraient d'une oxydation, et augmente ainsi la pression osmotique.

L'alcool méthylique à la concentration de 6,2 % vol. abaisse la tension superficielle jusqu'à ce qu'elle soit égale à celle du protoplasme qui entoure la cellule; à ce moment-là, les échanges sont facilités.

*Krehan*¹ fit sur les cellules végétales plusieurs séries d'expériences pour étudier l'action du cyanure en présence d'alcools. Des solutions de cyanure de potassium 0,002 n donnaient pour (C'—C) une valeur de 0,04. En ajoutant 1 % d'alcool méthylique à la solution du cyanure, il ne remar-

¹ Krehan. *Beiträge zur Physiologie*, etc. (1914) 237.

quait pas de différence pour cette valeur. L'alcool seul ne donnait pas de résultat, c'est compréhensible, car une si petite quantité d'alcool ne réussit pas à abaisser la tension superficielle d'une manière appréciable.

Avec 2 % d'alcool méthylique et une solution de 0,002 n de cyanure de potassium (C'—C) garde la même valeur que dans le cas précédent, par contre l'alcool seul à cette concentration donne à (C'—C) une valeur de 0,01. Avec 3 % d'alcool méthylique (C'—C) augmente de 0,01. Par rapport à une solution à 2 %, en présence du cyanure il y a un effet additif (C'—C) = 0,05.

En augmentant de plus en plus la concentration de l'alcool méthylique, la valeur (C'—C) diminuera, deviendra égale à 0, puis négative et croîtra en valeur absolue avec la concentration de l'alcool méthylique.

L'alcool méthylique en abaissant la tension superficielle agira sur la semiperméabilité, et facilitera l'entrée de l'oxygène, le cyanure de potassium agira directement sur la semiperméabilité et l'augmentera, il s'opposera en même temps à la respiration. Ces deux substances ont un même effet sur les cultures de bactéries lumineuses, mais leur manière d'agir est très différente.

Comme nous l'avons vu, ces deux corps ont une grande influence sur la prolongation de la durée de luminosité; si le résultat est le même, leur manière d'agir diffère. Nous avons étudié leur action dans la culture de bactéries lumineuses de la façon suivante :

Pour chaque série d'essais le cyanure est variable et l'alcool constant. D'une série à l'autre, l'alcool a été augmenté (Fig. XVIII).

1 ^{re} série d'essais avec des quantités croissantes de	CNK (témoin)
2 ^{me} » » » »	CNK + 0,2 cm ³ de CH ₃ OH
3 ^{me} » » » »	CNK + 0,4 »
4 ^{me} » » » »	CNK + 0,6 »
5 ^{me} » » » »	CNK + 0,8 »
6 ^{me} » » » »	CNK + 1,2 »
7 ^{me} » » avec des quantités croissantes de	CH ₃ OH (courbe de comparaison).

1^{re} série d'expériences avec cyanure seul.

				Durée de luminosité. Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	0,1 n + 1,95 cm ³ H ₂ O.	70
II.	8	» 0,1	» 1,9	125
III.	8	» 0,2	» 1,8	240
IV.	8	» 0,3	» 1,7	> 370
V.	8	» témoin	» 2	5

2^{me} série d'expériences avec cyanure + 0,2 cm³ CH₃OH.

I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	+ 0,2 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,75 cm ³ H ₂ O.	80
II.	8	» 0,1	» 0,2	» 1,7	» 105
III.	8	» 0,2	» 0,2	» 1,6	» 210
IV.	8	» 0,3	» 0,2	» 1,5	» > 360

3^{me} série d'expériences avec cyanure + 0,4 cm³ CH₃OH.

I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	+ 0,4 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,55 cm ³ H ₂ O.	107
II.	8	» 0,1	» 0,4	» 1,5	» 150
III.	8	» 0,2	» 0,4	» 1,4	» 174
IV.	8	» 0,3	» 0,4	» 1,3	» 185
V.	8	» 0,4	» 0,4	» 1,2	» 370

4^{me} série d'expériences avec cyanure + 0,6 cm³ CH₃OH.

I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	+ 0,6 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,35 cm ³ H ₂ O.	128
II.	8	» 0,1	» 0,6	» 1,3	» 140
III.	8	» 0,2	» 0,6	» 1,2	» 180
IV.	8	» 0,3	» 0,6	» 1,1	» 285
V.	8	» 0,4	» 0,6	» 1	» 370

5^{me} série d'expériences avec cyanure + 0,8 cm³ CH₃OH.

I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	+ 0,8 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,15 cm ³ H ₂ O.	15
II.	8	» 0,1	» 0,8	» 1,1	» 172
III.	8	» 0,2	» 0,8	» 1,0	» 245
IV.	8	» 0,3	» 0,8	» 0,9	» 255
V.	8	» 0,4	» 0,8	» 0,8	» 360

6^{me} série d'expériences avec cyanure + 1,2 cm³ CH₃OH.

						Durée de luminosité.
						Minutes.
I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,05 cm ³ CNK	+ 1,2 cm ³ CH ₃ OH	+ 0,75 cm ³ H ₂ O.		115
II.	8	» 0,1	» 1,2	» 0,7	»	155
III.	8	» 0,2	» 1,2	» 0,6	»	155
IV.	8	» 0,3	» 1,2	» 0,5	»	165
V.	8	» 0,4	» 1,2	» 0,4	»	180
VI.	8	» 0,5	» 1,2	» 0,3	»	265

7^{me} série d'expériences courbes de comparaison avec CH₃OH.

I.	8 cm ³ de bouillon	+ 0,2 cm ³ CH ₃ OH	+ 1,8 cm ³ H ₂ O.		5
II.	8	» 0,4	» 1,6	»	7
III.	8	» 0,6	» 1,4	»	7
IV.	8	» 0,8	» 1,2	»	9
V.	8	» 1	» 1	»	9
VI.	8	» 1,3	» 0,7	»	123

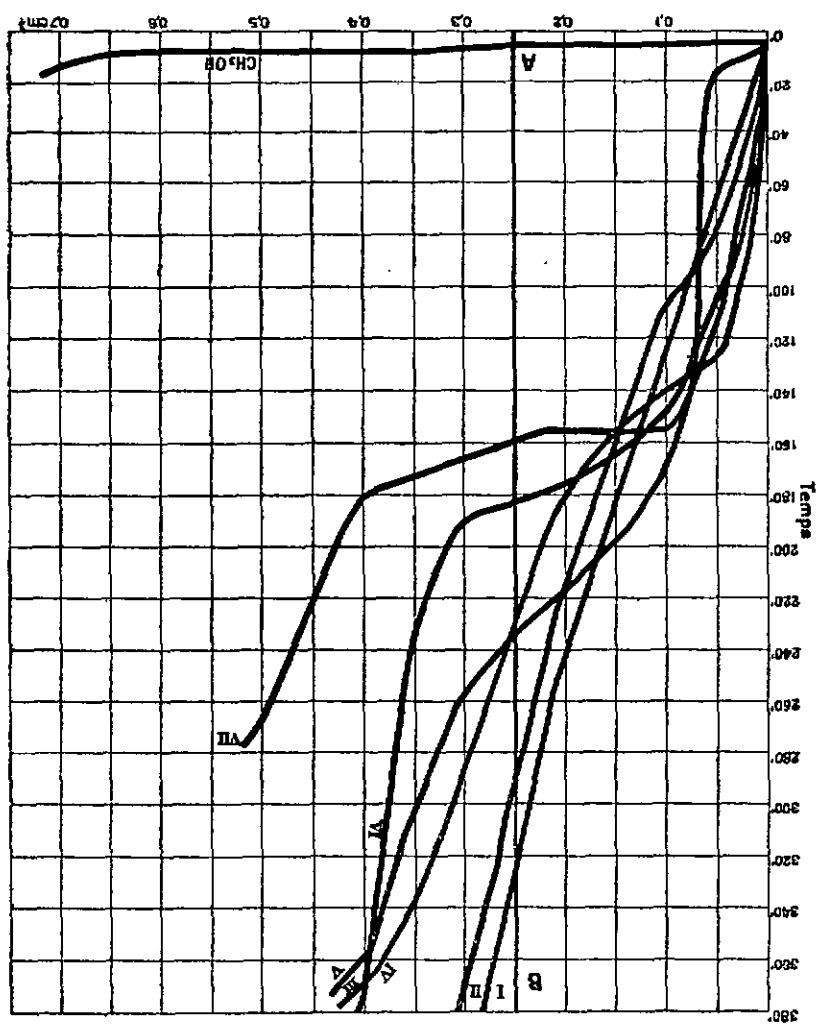
Si nous représentons graphiquement ces différents résultats (le temps en ordonnée, la concentration du cyanure de potassium en abscisse), nous obtiendrons sept courbes ayant un même point de départ, mais se séparant de suite les unes des autres.

I représente la durée de luminosité lorsque l'on ajoute des quantités croissantes de cyanure de potassium ; de ces sept courbes c'est elle qui s'élève le plus rapidement.

II représente la durée de luminosité lorsque l'on ajoute à des quantités croissantes de cyanure de potassium 0,2 cm³ d'alcool méthylique, cette courbe monte moins rapidement que I.

Il en sera de même pour les courbes III, IV, V, VI. La courbe VII représente l'action de l'alcool méthylique sur la luminosité, son optimum est moins élevé et se trouve plus à droite. A mesure que l'on ajoute des quantités croissantes de CH₃OH la durée de luminosité diminue, l'action du cyanure de potassium n'est pas additive à celle de l'alcool méthylique, ce dernier semble diminuer l'effet produit par KCN

Concentration de la solution de CaCl_2 n. 0,1 n. Fig. XVIII.



sur la cellule ; il y a cependant une restriction à faire lorsque l'on ajoute des petites doses de cyanure inférieures à 0,1 cm³, car à ce moment-là il y a addition des effets.

La ligne A B coupe les six courbes en des points où la concentration du cyanure de potassium est la même (0,25 cm³) mais où la concentration de l'alcool méthylique varie de 0,2 à 1,2 cm³. Dans un bouillon de culture contenant du cyanure de potassium, des quantités croissantes d'alcool méthylique auront pour effet de diminuer la durée de luminosité.

Il y a donc une action antagoniste entre ces deux substances, mais elles ne sont pas capables de s'annihiler, vu que leur manière d'agir est différente. Il est peu probable, même en ajoutant de grandes quantités d'alcool méthylique, qu'on arrive à annuler complètement l'effet produit par le cyanure de potassium.

CHAPITRE V

Étude de la lumière émise par le *Pseudomonas*.

Le phénomène de la phosphorescence est dominé par les recherches importantes d'*Edmond Becquerel*¹, qui ont montré d'une façon nette l'action antagoniste des radiations de courtes et de grandes longueurs d'ondes ; la luminosité produite par des radiations ultra-violettes est en effet diminuée, si l'on vient à faire tomber sur les corps phosphorescents des radiations infra-rouges. *Dufour* et *Rosselet*² prétendent avoir décelé une action semblable des deux extrémités du spectre sur la ionisation de l'air.

Il est intéressant pour nous de chercher à déceler ce phénomène de luminescence biologique et de regarder si la luminosité augmente ou diminue, si l'on arrive à exciter les bactéries par les différentes radiations du spectre.

Nous avons opéré de la manière suivante :

Des tubes de faible diamètre sont remplis jusqu'à mi-hauteur par le bouillon de *Motisch*, stérilisés, puisensemencés. Après deux jours, ils sont fortement lumineux. Ces tubes sont placés dans une éprouvette de diamètre double, rem-

¹ Edmond Becquerel. *La lumière, ses causes et ses effets*. Paris (1867).

² Rosselet. Thèse. Lausanne (1909).

plie d'un liquide coloré par des substances spéciales ne laissant passer que certaines radiations déterminées du spectre à l'exclusion des autres. Ces colorants ont été employés dans ce laboratoire pour étudier la croissance d'une plante, dans une lumière monochromatique. Nous avons pris pour ces expériences quatre couleurs différentes, rose, rouge, vert, violet. Ainsi protégés par ce manchon coloré qui ne laissera passer qu'une partie du spectre, ces différents tubes sont exposés à la lumière diffuse durant 6 à 7 heures par jour. Pour éviter autant que possible les erreurs d'observation, nous avons pour chaque coloration une série de trois tubes. Trois tubes témoins restaient à l'obscurité, tandis que trois tubes témoins étaient exposés avec les autres tubes à la lumière diffuse protégés par un manchon d'eau. Après cette durée d'exposition qui variait de 6 à 7 heures suivant les jours, les tubes étaient agités tous de la même manière et le temps qu'il leur fallait pour redevenir obscur était noté. Il s'agissait aussi de mesurer leur intensité lumineuse. Pour cette raison, nous avons fait une échelle de luminosité ainsi comprise: un bouillon âgé de deux jours était dilué avec des quantités croissantes d'eau.

1)	0,5 cm ³	de bouillon lumineux	+	4,5 cm ³	H ₂ O.
2)	1,0	»	»	4,0	»
3)	2,0	»	»	3	»
4)	3,0	»	»	2	»
5)	4,0	»	»	1	»
6)	5,0	»	»	0	»

De cette manière nous avons une échelle d'intensité lumineuse augmentant de 1 à 6. Cette échelle était à refaire pour chaque expérience quotidienne, vu que le bouillon employé devait avoir le même âge, si on désirait comparer les intensités lumineuses des différentes expériences. Pour chaque tube, nous notions son intensité et sa durée de luminosité. Ces expériences durèrent cinq jours avec lecture faite tous les soirs après l'exposition à la lumière (Tableau p. 82).

D'après le tableau, il semble ressortir que pour les tubes
DE COULON — 6

	1 ^{er} jour.	2 ^{es} jour.	3 ^{es} jour.	4 ^{es} jour.	5 ^{es} jour.	
3 tubes entourés d'un manchon rouge	Durée	10'-9'-9'	9'-9'-9'	8'-8'-8'	8'-8' - 10'	8',5-9' - 5'
	Intensité	II à III	IV à V	III (3 tubes) IV	I à II I	IV et V
3 tubes entourés d'un manchon rose	Durée	8'-9'-8'	9'-8'-5'	9'-9'-8'	8' 13'-13'	7',5-7'-9'
	Intensité	II à III	IV et V	IV et IV	III I	IV à V
2 tubes entourés d'un manchon vert	Durée	2'-3'	5',5-5',5	7'-8'	4',5 6',5	6' - 4'
	Intensité	V	V à VI	III à IV	III à IV II	VI sup. à VI
3 tubes entourés d'un manchon violet	Durée	2'-1',5-1',5	3'-4'-5'	8'-7'-7'	4',5'-5',5 4'	6' - 5',5'
	Intensité	V à VI	plus lumineux que VI	VI et V	III à IV II	VI sup. à VI
3 tubes entourés d'eau distillés (témoin)	Durée	10'-11'-7'	10'-9'-10'	12'-8'-11'	14' - 10'7'	11' - 9'-9'
	Intensité	III à IV	IV	III et IV	I à III III	IV VI
3 tubes restant dans la chambre noire	Durée	4'-5'-4'	3'-3',5-4',5	7',5-7'-6'	10' 12'-11'	plus grand que 15'
	Intensité	VI	plus lumineux que VI	IV et VI	I à II II	V
Durée d'exposition	7 heures.	7 heures.	6 1/2 heures.	7 heures.	8 heures.	

qui ont été excités par des rayons de grandes longueurs d'ondes, la luminosité sera plus faible que pour ceux qui ont été excités par de petites longueurs d'ondes ; il en est de même pour les tubes témoins exposés à la lumière et ceux restés à l'obscurité. Par contre, leur durée de luminosité est plus grande que celle des tubes exposés aux rayons les plus réfrangibles du spectre, plus petite que celle des tubes témoins, et passablement plus grande (durant les premiers jours d'expérience) que celle des tubes restés à l'obscurité.

Il ressort clairement de ce tableau que les courtes longueurs d'ondes (tubes vert et violet) ont pour effet d'augmenter l'intensité lumineuse, et que les grandes longueurs d'ondes (tubes rose et rouge) la diminuent si on s'en rapporte aux tubes témoins.

A mesure que l'intensité lumineuse croît, la durée de luminosité décroît.

L'action des différentes radiations du spectre que *Becquerel* a trouvée pour les corps phosphorescents, se trouve confirmée pour la bioluminescence du *Pseudomonas luminescens*.

La luminescence émise par les bactéries diffère en certains points de la phosphorescence du sulfure de calcium ; ce dernier n'est plus lumineux à la température de l'air liquide¹, ce qui n'est pas le cas pour la bioluminescence bactérienne ; elle supporte très bien cette température sans que sa luminescence s'en ressente (*Macfadgen*)².

Il en est de même pour la pression. *Lenard* et *Klatt*³ ont étudié l'effet de la pression sur la phosphorescence alcalino-terreuse. Ils ont remarqué que celle-ci devient plus sombre par la pression, l'action de la pression est accompagnée de l'apparition d'un éclat ; chez les bactéries, une augmentation de pression de 200 atmosphères durant 8 minutes ou de 230 atmosphères durant 1

¹ Le Roux. *Comptes-rendus* 140 (1905) 84.

² « The application of low temperatur to the study of biological problem. » *Chem. News.* 88, p. 193.

³ Lenard et Klatt. *W. a.* 38, p. 90, 1889.

minute n'a aucun effet sur la luminescence (*Suchsland*)¹.

La lumière émise par les bactéries influence la plaque photographique. 5 minutes sulfisent, une exposition de plusieurs heures est nécessaire pour obtenir une image nette et précieuse. En prenant des bouillons assez lumineux et en grande quantité, *Dubois* arriva à photographier non seulement les cultures lumineuses, mais des objets convenablement situés.

Ce même auteur crut trouver que la lumière bactérienne de même que les rayons de Röntgen pouvaient traverser des corps opaques comme le bois et le carton. *Mölich*², d'autre part, ainsi que *Suchsland*, obtinrent des résultats négatifs lorsqu'ils cherchèrent à impressionner une plaque photographique à travers des corps opaques.

Le spectre d'émission des bactéries lumineuses est continu et sans bande d'absorption (*Mölich*)³; il s'étend du jaune au commencement du bleu. Ce spectre varie dans de faibles limites d'une espèce à l'autre.

Une culture de bactérie lumineuse a la même propriété que chaque source lumineuse de provoquer un héliotropisme positif chez les plantes en germination. L'expérience est facile à faire avec des pois qui germent; sous l'influence de cette lumière, ils prendront une position typique, une exposition de 4 heures suffit. *B. Issatchenko*⁴ prétend avoir obtenu un verdissement de la plantule du trèfle exposé à la lumière des bactéries lumineuses. Déjà après 24 heures il y avait un verdissement que l'on arrivait à déceler par la bande d'absorption de la chlorophylle. *Mölich*⁵ qui fit des expériences analogues avec différentes plantes en germination n'obtint jamais ces résultats et remarqua seulement que la plante était positivement héliotropique en présence de la lumière bactérienne.

¹ Suchsland. *Physikalische Studien über Leuchtakterien*. Halle 1898.

² Mölich. *Leuchtende Pflanzen*. (1904) 138-140.

³ B. Issatchenko. « Quelques expériences avec la lumière bactérienne. » *Centralblatt für Bak.* 10 (1903) 497-499.

⁴ Mölich. *Leuchtende Pflanzen* (1904) 138-140.

CHAPITRE VI

La fonction photogénique.

Maintenant que nous savons que l'oxygène est nécessaire pour produire la luminescence chez les bactéries et nous basant sur les résultats obtenus, il nous est possible de tirer quelques conclusions de cette fonction spécifique.

On a longtemps cru que ces phénomènes étaient liés à un dégagement de combinaison hydrogénée du phosphore. Phipson⁴⁻⁵ le premier s'éleva contre cette interprétation ; il démontra que la luminescence des poissons morts n'était pas due à des combinaisons hydrogénées du phosphore, et encore moins à des microorganismes. Il attribuait ce dégagement de lumière à un corps organique qui a une aussi grande affinité pour l'oxygène que ce dernier élément en a une pour le phosphore. Il nomma cette substance capable d'émettre de la lumière la « *Nocticutine* », ce corps serait la cause de la luminosité des poissons morts, de la viande de boucherie, des vers de terre, en un mot, de tous les phénomènes de bioluminescence ; il n'a jamais réussi à isoler ce corps qui était tout simplement des amas de colonies

⁴ Phipson. « Sur la matière phosphorescente de la raie. » *Comptes-rendus* 51 (1860) 541-542.

⁵ Phipson. « Sur la Nocticutine. » 75 (1872) 547-549.

bactériennes qui se trouvaient à la surface des corps lumineux.

*Radziszewsky*¹ trouva plusieurs corps chimiques qui, dissous dans la soude en présence de l'oxygène naissant, émettaient une forte lumière comme la méthylaldéhyde, paralaldéhyde, métaldéhyde, acoléine, lophine, ainsi qu'un bon nombre d'huiles essentielles. La lumière émise par ces différents corps chimiques en s'oxydant (solutions alcalines) avait une forte ressemblance avec la lumière des bactéries lumineuses, les spectres des différents corps chimiques qui émettaient de la lumière en s'oxydant étaient analogues et non identiques à ceux des bactéries lumineuses.

D'après les expériences de *Beyerinck*², le pouvoir lumineux de la solution de lophine croît continuellement jusqu'à 60°, se comporte comme un processus chimique ordinaire. Il ne peut donc être question de chercher une analogie entre ces phénomènes purement chimiques et la luminescence des bactéries ; nous avons fait un essai qui nous montre nettement que le résultat de *Beyerinck* est concluant et qu'on ne peut attribuer la bioluminescence à un des corps chimiques indiqué par *Radziszewsky*. Nous avons mesuré pour un microcoque lumineux l'action de la température de 0 à 30°. L'optimum pour cette espèce se trouve vers 14°, le minimum autour de 0°, le maximum au-dessus de 25°. La courbe est régulière et la luminosité cesse lorsque la température devient préjudiciable à la vie du microorganisme.

*Raphaël Dubois*³, dans son étude sur la luminescence des Pholades, arriva à des conclusions semblables à celles que trouva *Phipson* ; il admet l'existence d'un corps lumineux appelé la *luciférine*, cristallisable, qui deviendrait lumineuse en présence de l'oxygène, grâce à l'action d'une enzyme, la *luciferas* qui rend l'oxygène actif.

¹ Radziszewsky. « Ueber das Leuchten des lophins ». *Berichte der Deutsch. Chem. Gesell.* 10 (1877) 70.

² Beyerinck. « Aliments photogène et plastique ». *Annales néerlandaises.* 24 (1891) 423.

³ Raphaël Dubois. *Comptes-rendus.* 105 (1887) 690.

Pour obtenir ces deux corps, il s'y prenait de la manière suivante : il râclait la partie intérieure du siphon chez un Pholade, broyait la masse obtenue avec du sable et de l'alcool à 90°, et laissait le tout macérer durant 12 heures — filtrait et obtenait un liquide non lumineux. Le résidu qui avait été épuisé par l'alcool était pressuré et traité avec de l'eau chloroformée plusieurs heures puis filtrée. Ce filtrat ne donnait aucune luminosité. Les deux filtrats séparément n'étaient pas lumineux, mais si on les mélangeait, il se produisait un dégagement de lumière. Le second de ces deux filtrats traité par l'alcool concentré ou par une ébullition prolongée donnait un précipité floconneux et perdait sa propriété de dégager de la lumière si on le mélangeait au premier. Celui-ci contenait la *luciférine*, corps cristallisable, celui-là la *luciferas*, ferment détruit par la chaleur.

Personne jusqu'à maintenant, à ce que je sache, n'a confirmé cette manière de voir.

*Beyerinck*¹, dans un travail paru dans les *Archives néerlandaises* en 1891, considère la fonction photogénique comme liée à la matière vivante, ainsi qu'il suppose que c'est le cas pour la fonction fermentative. (Les travaux de *Miquel* sur l'uréase bactérienne ainsi que ceux de *Büchner* sur l'extraction de la zymase en 1897 ont montré que *Beyerinck* se trompait en admettant que la fonction fermentative était intimement liée à la matière vivante.) Ce même auteur prétend que c'est la peptone qui sert d'aliment à la bactérie ; il dit que la peptone en se transformant en matière vivante dégage de la lumière. La première objection que l'on peut faire à cette manière de voir est que tous les microorganismes qui croissent sur des milieux peptonés ne sont pas lumineux ; cela provient de ce que la matière vivante des différents microorganismes n'est pas la même et qu'un corps en se transformant ne donne pas toujours des produits finaux identiques.

¹ *Beyerinck*. « L'aliment photogène et plastique. » *Archives néerlandaises*. 2A (1891) 421.

Nous ne pouvons pas souscrire à cette manière de voir, car nous avons obtenu des cultures de bactéries très lumineuses dans du bouillon ne contenant pas trace de peptone, ni de substance azotée organique.

*Pflüger*¹ admet que la fonction photogénique est produite par la matière vivante, du moment qu'il y a une réaction après une excitation.

Nous pouvons conclure en admettant d'après nos recherches que la matière qui produirait la lumière fait partie de la matière vivante, qu'elle y serait fortement liée comme c'est le cas pour certains ferments. La combinaison avec l'oxygène de ce corps que nous nommerons d'après *Molisch photogène* se fait à l'intérieur de la cellule, il ne diffuse pas à l'extérieur et n'est pas séparable par filtration du bouillon de culture sur une bougie de Chamberland. Les diminutions de la semiperméabilité ne permettent pas à ce corps de diffuser à l'extérieur, ce qui prouverait sa liaison ferme avec le protoplasme. L'eau est aussi nécessaire que l'oxygène pour la luminosité, une culture sèche ne donne plus aucune lumière. La luminescence doit nettement être envisagée comme un phénomène différent de la respiration, du moment que nous avons dans une partie de nos recherches pu supprimer cette dernière en faveur de la luminescence.

¹ Pflüger. « Die Phosphorescence der lebenden Organismen und ihre Bedeutung für die Funktion der Respiration. » *Pflüger's Archiv*. 10 (1875) 275.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Nos travaux avaient pour but d'étudier la lumière émise par le *Pseudomonas luminescens*; de chercher à quoi on pouvait attribuer cette luminescence, de voir s'il était possible, en influençant le milieu de culture, de faire varier cette fonction, et dans quel sens, d'étudier si la fonction respiratoire était dépendante de la fonction lumineuse et dans ce sens quels seraient leurs rapports, de chercher à élucider le rôle de l'oxygène dans ce phénomène, et sous quelle forme cet élément devait se trouver, et de regarder si ce *Pseudomonas* était capable de réduire des combinaisons oxygénées et d'employer cet élément pour ses fonctions respiratoire et lumineuse; de quelle manière la lumière émise par ces bactéries pouvait être influencée par les radiations des deux extrémités du spectre.

La première recherche qui s'imposait était d'étudier le milieu de culture, et de le simplifier autant que possible. Nous avons cherché à remplacer la peptone et l'extrait de viande obtenu par macération par des combinaisons azotées équivalentes au point de vue azote. Ainsi la peptone a pu être avantageusement remplacée par du glycocolle, alanine, asparagine, urée, tartrate d'ammonium, nitrate d'ammonium et nitrate de potassium. Aux milieux de culture liquide, nous avons toujours ajouté du carbonate de calcium pour maintenir l'alcalinité du bouillon. Les hydrates de carbone comme

la glucose, galactose, maltose, xylose, fructose, arabinose, mannose et les alcools polyatomiques, érythrite, mannite, dulcité peuvent très bien remplacer la saccharose comme source de carbone. La concentration de ces différents corps qui donna les meilleurs résultats était de 2 %. La glycérine ne peut remplacer les hydrates de carbone comme source de carbone. En diminuant sensiblement la concentration de la glucose dans les milieux de culture, il nous a été possible d'obtenir des bouillons de culture lumineux avec une concentration de 0,04 % de glucose; le tube, il est vrai, est peu lumineux; en ensemençant à partir de ce milieu là des tubes ne contenant pas de sucre du tout, nous avons aperçu après 10 jours une très faible luminescence qui ne dura pas. Probablement les bactéries se servaient du carbone de l'urée qui était ici le porteur d'azote. Si nous faisons deux séries d'essais, dans la première série l'hydrate de carbone est constant, et le corps azoté variable; dans la seconde série, cela sera l'inverse; nous remarquons que le rapport de ces deux corps qui donne le meilleur résultat est de 2% de sucre et X % de substance azotée (c'est-à-dire celle qui contiendrait 0,13 gr. de N pour 100 cm³ de liquide).

Des six sels entrant dans la composition du milieu de culture de *Molisch* modifié, tous sont nécessaires à la vie du *Pseudomonas* sauf le sulfate de potassium, vu que le potassium se trouve déjà sous forme de phosphate de potassium, et le radical SO₄ sous forme de sulfate de magnésium. Le chlorure de sodium que *Molisch* ajoutait dans son milieu de culture à raison de 3 % n'avait pour but que d'élever la pression osmotique du milieu, et n'avait aucun rôle nutritif. Si c'est le cas, il doit être remplaçable par d'autres électrolytes. Une solution de chlorure de sodium à 3 % abaisse le point de congélation de l'eau de 1,759°; un % d'un corps quelconque qui produira le même abaissement pourra théoriquement remplacer les 3 % de NaCl. Nous avons essayé dix électrolytes différents, tous ont donné des résultats favorables.

Connaissant maintenant le milieu de culture tant au point

de vue qualitatif que quantitatif et nous étant rendu compte que tous les sels indiqués par *Molisch* étaient nécessaires à la vie des bactéries (à part SO_4 , K_2 et le sucre) nous pouvons faire un pas en avant et étudier le rôle de l'oxygène dans la luminescence. L'oxygène est nécessaire; sans lui pas de luminosité. Des quantités infimes de cet élément suffisent pour entretenir la luminosité. 0.004 mm^3 suffisent pour entretenir 1 cm^3 du bouillon lumineux durant 1 minute (bouillon âgé d'un jour). L'oxygène peut être fourni par la réduction du bleu de Méthylène. La réduction de l'indigo en indigo blanc se faisant très lentement on ne peut pas arriver à observer une prolongation de la luminescence. Réduction du sulfite de sodium jusqu'au dégagement de l'hydrogène sulfuré. Réduction de KNO_3 en KNO_2 . La luminescence peut indifféremment être provoquée par l'oxygène moléculaire et l'oxygène actif. De la catalase (quantité constante) ajoutée à des quantités croissantes d'eau oxygénée provoque une durée de luminosité augmentant proportionnellement avec l'eau oxygénée ajoutée (oxygène moléculaire). La durée de luminosité graphiquement représentée donne une ligne droite. Si la catalase est variable, l'eau oxygénée constante, nous obtenons une ligne montant rapidement, puis devenant sensiblement parallèle à l'axe des X pour les durées de luminosité. Pour que cette réaction aille de l'avant, il faut que l'eau oxygénée et le ferment soient dans un certain rapport, dans ce cas $0,12 \text{ cm}^3$ de solution de catalase et $0,8 \text{ cm}^3$ de solution d' H_2O_2 . Un excès de ferment n'intervient pas dans la réaction. Pour le système peroxydase H_2O_2 (dégagement de l'oxygène actif) nous obtenons les mêmes courbes que pour la catalase, suivant que l'un ou l'autre est constant. Même interprétation. La peroxydase seule ne donne aucun résultat comme prolongation de la luminosité, on ne peut donc admettre l'existence d'un peroxyde organique engendré par la bactérie et qui pourrait avantageusement remplacer l'eau oxygénée.

Les alcools en solution abaissent la tension superficielle

de l'eau, de même qu'ils diminuent la semiperméabilité de la membrane cellulaire, lorsque la tension superficielle du liquide ambiant devient égale à celle de la couche de protoplasme entourant la cellule; les échanges avec l'extérieur peuvent se faire facilement. *Czapek* qui étudia l'action des alcools sur la plasmolyse des cellules végétales, trouva que pour des concentrations équimoléculaires des différents alcools, l'abaissement de la tension superficielle augmentait avec le poids moléculaire. Quand elle atteignait la valeur de 0,6 à 0,7, l'échange entre la cellule et le milieu extérieur était facilité. Pour cet auteur l'exosmose se produisait pour deux solutions équimoléculaires d'alcool méthylique et d'alcool éthylique, lorsque les concentrations en volumes étaient de 18 % pour l'alcool méthylique et 11 % pour l'alcool éthylique. Dans notre cas l'optimum de la durée de luminosité correspond à une concentration de 10 % en volume pour $\text{CH}_3 \text{OH}$ et 6,2 % pour $\text{C}_2 \text{H}_5 \text{OH}$. Le rapport de *Czapek* est de $\frac{18}{11}$ et le nôtre de $\frac{10}{6,2}$, ce qui est à peu près égal. C'est donc lorsque la diminution de semiperméabilité a atteint une certaine valeur, la même dans les deux cas, que la durée de luminosité est maximale. L'éther abaisse aussi la semiperméabilité, donc il aura pour effet d'augmenter la durée de luminosité. A mesure que le bouillon de culture prend de l'âge, sa sensibilité vis-à-vis des excitants augmente, ainsi que sa durée de luminosité. Le rapport de la durée de luminosité entre le tube témoin et celui qui correspond à l'optimum recte sensiblement le même. (Dans nos 3 cas le rapport était 3,1 — 3 — 3.)

Le cyanure de potassium s'oppose à l'échange des gaz, donc a un effet néfaste sur la respiration. En ajoutant des quantités croissantes de cyanure de potassium dans le bouillon de culture, on verra la durée de luminescence augmenter jusqu'à une certaine concentration de cyanure, puis diminuer brusquement. L'oxygène introduit par agitation a été en grande partie employé pour l'oxydation de la substance

luminescente au détriment de la respiration. On a ainsi démontré que la bioluminescence était indépendante de la respiration, ensuite que dans ce phénomène-là il ne se dégage pas de l'acide carbonique par oxydation de la substance luminescente, car CNK même à une dose très faible s'opposerait à ce phénomène. L'action du cyanure de potassium est à attribuer en grande partie au complexe CN ainsi qu'à l'alcalinité du milieu. Des solutions de soude et de potasse caustique augmentent la semiperméabilité et augmentent ainsi la durée de luminosité. Pour des solutions équimoléculaires d'acide, ajoutées en quantités égales, la durée de luminosité sera augmentée. Si à un tube contenant du CNK, dont la durée de luminosité est 100 par exemple, on ajoute des quantités croissantes de CH_3OH , on verra que la durée de luminescence diminuera à mesure que la concentration de l'alcool augmentera. Il y a donc un effet antagoniste entre ces deux substances qui produisent les mêmes effets.

En exposant des tubes de culture lumineuse à la lumière diffuse et en prenant soin qu'ils ne soient influencés que par certaines radiations (manchon d'eau colorée) on verra que les tubes qui ont été excités par les rayons de courtes longueurs d'ondes sont les plus lumineux et que leur durée de luminescence par contre est courte; les tubes excités par les rayons de grandes longueurs d'ondes sont peu lumineux, mais leur durée de luminosité est plus grande. Les rayons très réfrangibles du spectre ont donc un effet excitant sur la bioluminescence et le contraire se passe pour les rayons peu réfrangibles.

.



CONCLUSION

I. La luminescence est indépendante de la respiration. Avec la mort de la cellule le phénomène de bioluminescence prend fin.

II. Le phénomène de bioluminescence est intracellulaire, et c'est l'oxygène qui doit parvenir à l'intérieur de la cellule.

III. L'oxygène nécessaire à la bioluminescence peut être de l'oxygène atmosphérique ou de l'oxygène actif mis en liberté par la réduction d'un corps chimique.

IV. Les alcools dans la concentration de 10 % vol. pour l'alcool méthylique et 6,2 % vol. pour l'alcool éthylique abaissent la tension superficielle du milieu et diminuent aussi la semiperméabilité, ce qui permettra à l'oxygène de diffuser à l'intérieur de la cellule. Il en résultera une augmentation de la durée de luminosité.

V. Le cyanure de potassium augmente aussi la semiperméabilité tout en s'opposant à l'échange des gaz (respiration); de cette manière tout l'oxygène dissous dans le liquide ne servira qu'au phénomène de luminescence. Il faut attribuer cet effet au complexe cyanogène qui est un complexe lucigène. Les H⁺ et OH⁻ ont aussi une influence sur la semiperméabilité et sur l'augmentation de la durée de luminosité.

VI. Les rayons de courtes longueurs d'ondes augmentent l'intensité lumineuse, ceux de grandes longueurs d'ondes la diminuent.

TABLE DES MATIÈRES

	Pag.
PARTIE HISTORIQUE	7
INTRODUCTION	11
CHAPITRE PREMIER. — Étude du milieu de culture.	17
Étude de la source d'azote	20
Étude de la source de carbone	26
Étude de la valeur des différents hydrates de carbone	28
Diminution graduelle de la saccharose.	31
Influence des sels du milieu de culture modifié de Molisch	33
Peut-on remplacer le chlorure de sodium par un autre électrolyte	35
CHAPITRE II. — Influence et rôle de l'oxygène dans la bioluminescence du <i>Pseudomonas luminescens</i>	37
CHAPITRE III. — Substance abaissant la tension superficielle et diminuant la semipermeabilité	51
CHAPITRE IV. — Action du cyanure de potassium sur la semipermeabilité.	63
Action antagoniste de CNK et de CH_3OH	74
CHAPITRE V. — Étude de la lumière émise par le <i>Pseudomonas luminescens</i>	80
CHAPITRE VI. — La réaction photogénique	85
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	89
