

Les tests microbiologiques pour la détermination des vitamines

Par W. H. SCHOPFER, Berne

(suite)

Qualités requises pour que le microorganisme puisse fonctionner comme test

En théorie, tout microorganisme exigeant une vitamine pour sa croissance doit pouvoir être utilisé comme test. En pratique, ce n'est pas le cas. Les qualités suivantes sont requises: 1° Le microorganisme doit être facilement cultivable et si possible non pathogène. 2° La physiologie de son métabolisme doit être connue d'une manière aussi détaillée que possible: nutrition azotée, carbonée, minérale, optimum de pH et de température. La connaissance de ses besoins permettra de lui constituer un milieu synthétique de base, simple et complet, permettant à la vitamine ajoutée d'exercer son effet. 3° Le degré de son auxo-hétérotrophie doit être connu et il ne doit, si possible, exiger qu'une ou peu de vitamines. La vitamine requise doit, si possible, être facteur essentiel, en l'absence duquel aucun développement ne se produit. Si le facteur requis est simplement complémentaire, additionnant son effet à celui d'autres vitamines, les mesures, toujours possibles, sont plus délicates. 4° Il doit présenter une grande constance physiologique et ne pas varier ses besoins. Il ne doit pas donner naissance à des races physiologiques (mutants) manifestant des variations du degré d'auxo-hétérotrophie¹. 5° Il doit être facilement inoculable: suspension de spores pour un champignon, suspension de cellules lavées pour une bactérie. L'inoculation avec un fragment de thalle de champignon ne permet pas d'obtenir des résultats précis. 6° Il doit croître rapidement et surtout permettre une mesure rapide et facile de son développement. Certains champignons inférieurs, réagissant très fortement à la présence de faibles doses de vitamines, semblent constituer des réactifs de choix. Ils sont en réalité inutilisables, car ils ne fournissent que des courbes irrégulières, capricieuses, et les résultats ne sont pas suffisamment reproductibles. 7° Il ne doit pas être trop fortement influencé par les substances banales du milieu, qui tendent à modifier l'allure de la courbe de croissance. 8° Le microorganisme doit réagir d'une manière très spécifique à la présence de la vitamine en question. Dans la majorité des cas cette spécificité est très marquée, voisine de celle de l'animal (aneurine, lactoflavine, adermine par exemple). Il ne faut pas oublier que pour la plupart des vitamines importantes en physiologie animale et humaine, un nombre restreint d'animaux ont servi de tests. Pour les microorganismes par contre, une seule vitamine a

pu être étudiée avec une douzaine d'espèces différentes. Nous avons déjà relevé le danger que peuvent présenter les organismes qui, au premier abord, semblent exiger la molécule complète d'une vitamine mais qui, en réalité, se contentent d'une portion de la molécule et synthétisent l'autre, ou encore sont capables de réunir les deux moitiés de la molécule (pyrimidine et thiazol pour l'aneurine, β -alanine et acide- α,γ -dioxo- β,β -diméthylbutyrique pour l'acide panto-thénique). L'inconvénient n'est pas si grave, car il n'est pas certain que les deux constituants, représentant effectivement les étapes ultimes de la biosynthèse, s'accumulent dans la nature en doses telles que les résultats fournis par le test soient faussés. Comme nous l'avons vu, l'utilisation du test *Phycomyces* n'est pas rendue impossible par le fait que la pyrimidine et le thiazol peuvent remplacer la molécule complète d'aneurine. 9° Le microorganisme doit présenter une grande sensibilité à la présence de la vitamine et une faible dose doit suffire pour déclencher un développement perceptible et mesurable. Il ne doit pas seulement réagir à la présence d'une très faible quantité de facteur vitaminique, mais également répondre par une augmentation marquée de la croissance à l'adjonction d'une faible quantité supplémentaire de cette vitamine. Là, nous trouvons une caractéristique qui, indiscutablement, parle en faveur du microorganisme. Le tableau suivant indique, pour quelques organismes, les doses minimales observées dans des conditions culturelles données:

Tableau 6

Aneurine	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	1:2,5·10 ⁹
	<i>Ustilago violacea</i> (SCHOPFER et BLUMER ¹)	1:2,5·10 ¹⁰
	<i>Glaucoma piriformis</i> (Cilié) (EMERIQUE-BLUM et LWOFF ²)	1:1·10 ¹⁰
Biotine (vitamine H)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KÖGL ³)	1:4·10 ¹¹
	(SNELL, EAKIN et WILLIAMS ⁴)	1:5·10 ¹¹
	<i>Candida Guillermondii</i> (SCHOPFER ⁵)	1:1·10 ¹²

¹ W. H. SCHOPFER, S. BLUMER et V. KOCHER, Arch. f. Mikrobiol. 9, 305 (1938).

² L. EMERIQUE-BLUM et A. LWOFF, Bull. Soc. chim. biol. Paris 22, 179 (1940).

³ F. KÖGL und B. TÖNNIS, Z. Physiol. Chem. 242, 43 (1936).

⁴ E. SNELL, R. E. EAKIN and R. J. WILLIAMS, J. Amer. chem. Soc. 62, 175 (1940).

⁵ W. H. SCHOPFER, C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 61, 147 (1944).

¹ Souvent seules quelques souches déterminées d'une espèce sont complètement auxo-hétérotrophes et peuvent être utilisées avec succès comme test.

Lactoflavine	<i>Lactobacillus casei</i> (SNELL et STRONG ¹)	$1:0,4 \cdot 10^9$
Adermine	<i>Ceratostomella ulmi</i> (SCHOPFER, inédit)	$1:2 \cdot 10^9$

Ces conditions essentielles étant réalisées, il est possible de construire le graphique permettant, selon la technique décrite pour le test *Phycomyces*, d'affectuer les calculs précis. Ceux-ci ne peuvent être faits que dans une portion limitée des courbes, dans laquelle une proportionnalité exacte se manifeste entre la dose de vitamine et l'effet produit.

La détermination quantitative du développement

L'organisme se développe sur un milieu de composition connue. L'analyse peut porter soit sur l'organisme, soit sur le milieu qui se modifie au cours de la croissance. Nous pouvons envisager les techniques suivantes:

I. Analyse de l'organisme

A. Poids de matière formée

- 1^o *Gravimétrie*: Détermination du poids sec total de matière produite. Possible avec tous les champignons inférieurs. Egalement utilisable avec les unicellulaires.
- 2^o *Néphélométrie*: Le développement est apprécié par la quantité de lumière absorbée. Méthode de choix pour toutes les cultures d'unicellulaires (bactéries, levures, *Candida*, etc.) qui n'ont pas la tendance à former un pseudomycélium (voir fig. 8).
- 3^o *Numération* des cellules produites dans un volume déterminé de milieu. Peu utilisé dans la pratique.

- B. Détermination du poids d'un constituant de la matière vivante formée. La quantité de cette substance est proportionnelle au poids total de matière vivante produite. Par exemple détermination de l'azote total de *Corynebacterium diptheriae* (MUELLER).

II. Analyse du milieu

- A. Détermination de l'absorption d'un constituant du milieu. Cette dernière est proportionnelle au développement, dans des limites définies. Diminution de la concentration totale, déterminée par une méthode physique (réfractométrie par exemple), diminution du taux en sucre, en azote. Modifications du pH, etc.
- B. Détermination d'un produit du métabolisme accumulé dans le milieu. Acide lactique (B. lactiques) (fig. 10), alcool ou CO₂ (levures), acide pyruvique (*Phycomyces*), etc.

Les méthodes faisant intervenir la gravimétrie, la néphélométrie, ou la détermination d'un produit du métabolisme sont les plus couramment utilisées.

¹ E. E. SNELL and F. M. STRONG, Ind. and Engin. Chemistry, vol. 11, n^o 6, p. 346.

Les principaux tests pour la détermination des vitamines hydrosolubles

Les principales vitamines hydrosolubles, importantes pour l'alimentation humaine et animale, peuvent être déterminées à l'aide d'un test microbiologique. Nous en faisons une courte énumération qui témoignera de l'importance que sont en train de prendre ces méthodes.

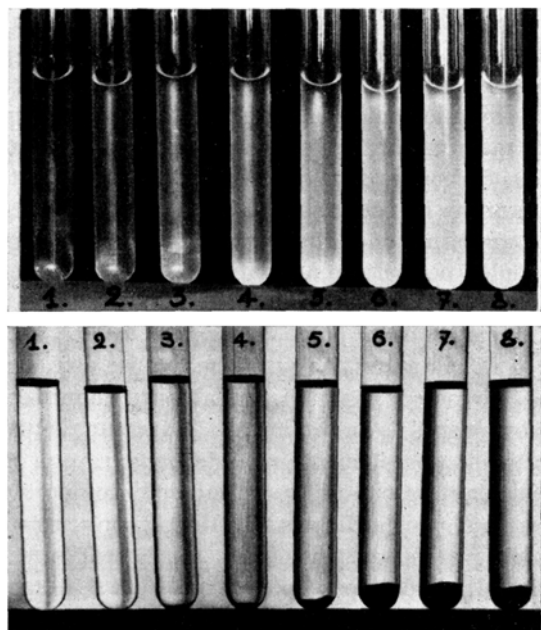


Fig. 8. Développement d'*Ustilago violacea* sur milieu synthétique, en présence de doses croissantes d'aneurine. En haut: les cellules sont en suspension. En bas: dépôt de la culture.

n ^o	1	2	3	4	5	6	7	8
mg B ₁ /25 ccm.	0	1	2	4	6	10	20	40

Dose optimale vers 10 mg. (D'après SCHOPFER, BLUMER et KOCHER ¹.)

Aneurine. Organismes utilisés. *Phycomyces blakesleeanus*: détermination du poids sec des récoltes. *Glaucoma piriformis* (Protozoaire Cilié): la numération des cellules permet d'apprécier quantitativement la croissance (LWOFF², EMERIQUE-BLUM et LWOFF³) (voir fig. 9).

La croissance, critère utilisé ici, est une résultante de nombreux facteurs dont la majorité sont indépendants de l'aneurine. SCHULTZ, ATKIN et FREY⁴ emploient comme critère la quantité de CO₂ produite par la fermentation alcoolique de *Saccharomyces cerevisiae* accélérée par l'adjonction de vitamine B₁. La pyrimidine seule agit déjà, mais la méthode peut être rendue spécifique. Elle a d'ailleurs fait ses preuves.

¹ W. H. SCHOPFER, S. BLUMER et V. KOCHER, Arch. f. Mikrobiol. 9, 305 (1938).

² A. et M. LWOFF, C. R. Soc. Biol. Paris 126, 644 (1937).

³ L. EMERIQUE-BLUM et A. LWOFF, Bull. Soc. chim. biol. Paris 22, 179 (1940).

⁴ A. SCHULTZ, L. ATKIN and N. FREY, J. Amer. Chem. Soc., 59, 948 (1937).

HAAG¹, après avoir découvert la production d'acide pyruvique par *Phycomyces* cultivé en hypovitaminose, propose un nouveau principe de dosage (HAAG et DALPHIN²). Le maximum d'acide pyruvique, dans un milieu défini et constant, est produit avec 0,08 γ d'aneurine pour 20 ccm. de milieu (la dose optimale de vitamine étant de 0,4 γ environ!). Il suffirait donc d'ajouter au milieu de base constant des doses croissantes de substance inconnue dont le taux en aneurine doit être déterminé. Le volume de solution détermi-

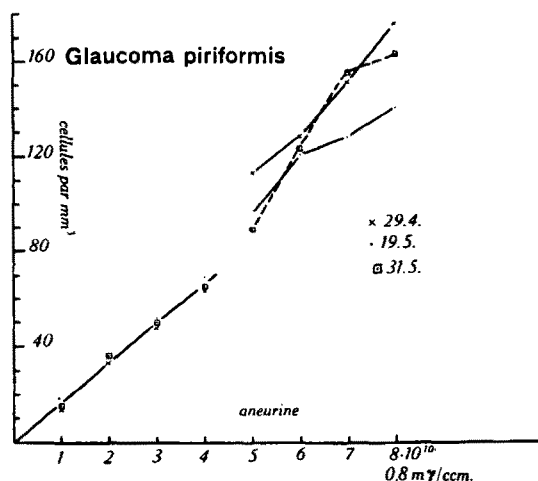


Fig. 9. Développement de *Glaucoma piriformis* sur milieu à base de peptone de soie, en présence de doses croissantes d'aneurine. Sur l'ordonnée nombre d'organismes par mm³. Dans la partie inférieure du graphique on note une proportionnalité satisfaisante entre le développement et la dose de vitamine. (D'après L. EMERIQUE-BLUM et LWOFF³.)

nant la plus forte production d'acide pyruvique contiendra 0,08 γ de vitamine B₁. Il reste à établir si la quantité de 0,08 γ d'aneurine, censée déterminer la plus forte production d'acide pyruvique, est vraiment constante. Si tel était le cas, et si les substances banales de l'extrait à analyser n'influencent pas la production d'acide pyruvique, la méthode serait excellente. Ces deux méthodes prennent comme critère un produit spécifique du métabolisme en relation directe avec la vitamine B₁.

WESTENBRINK et ses collaborateurs⁴ s'inspirent du même principe. La levure, lavée en milieu alcalin, est privée de sa cocarboxylase (pyrophosphate d'aneurine). Elle n'est plus capable de décarboxyler l'acide pyruvique et de produire du CO₂. Cette levure, jointe à une substance contenant du pyrophosphate d'aneurine adsorbe ce dernier, ce qui permet une resynthèse

de la carboxylase. Ainsi, le microorganisme, mis en présence de pyruvate de sodium, est à nouveau capable de décarboxyler ce dernier. La quantité de CO₂ produite, proportionnelle à la quantité de pyrophosphate d'aneurine absorbée par la levure est mesurée manométriquement. Des comparaisons avec des courbes étalons permettent un dosage avec une précision de 1%.

D'autres organismes ont été proposés, mais n'ont pas donné lieu à l'établissement d'un test pratique. *Phytophthora cinnamomi*¹ (champignon Phycomycète), comme *Glaucoma piriformis*, requiert la molécule complète d'aneurine. Cependant, ce champignon doit être inoculé avec des fragments de thalle, ce qui rend l'expérience pénible. Nous l'avons utilisé avec succès comme test semi-quantitatif. Il nous a permis de démontrer la synthèse de l'aneurine à partir de la pyrimidine et du thiazol, chez *Phycomyces* et d'autres organismes qui se contentent des deux constituants de la vitamine qu'ils soudent à nouveau.

Des bactéries, telles que *Staphylococcus aureus*, *Rhizobium trifolii*, *Propionibacterium pentosaceum* réagissent également à la présence de faibles doses d'aneurine. Elles sont peu utilisées dans la pratique.

Il faut encore mentionner un test original, constitué par un insecte, *Drosophila*. Comme GUYÉNOT² l'a démontré depuis longtemps, l'élevage des larves en milieu aseptique n'est possible qu'en présence d'un extrait de levure. VAN 'T HOOG³ a prouvé que les vitamines de l'extrait de levure sont les substances actives requises pour le développement et la métamorphose des larves. Nous retrouvons ici l'aneurine comme vitamine essentielle, ainsi que la vitamine B₂. Dans des conditions définies, entre 0 et 0,5 γ d'aneurine par culture de 10 ccm, le % de larves susceptibles de se métamorphoser est proportionnel à la dose de vitamine présente. L'utilisation du test se heurte à certaines difficultés de nature technique.

A propos de l'aneurine, il faut encore rappeler que R. J. WILLIAMS⁴, en 1919 déjà, a proposé la levure pour la détermination de la vitamine B₁. A cette époque, cette vitamine n'était pas isolée chimiquement et confondue avec le «bios» d'alors, c.-à-d. les facteurs essentiels pour la levure. Ce qu'on croyait mesurer avec la levure n'était donc pas la vitamine B₁ et ce premier essai n'eut pas de lendemain.

Lactoflavine. La méthode, devenue rapidement classique de SNELL et STRONG⁵, fait usage de souches de *Lactobacillus casei*. Le milieu utilisé n'est à vrai dire

¹ E. HAAG, C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 57, 136 (1940).

² E. HAAG et CH. DALPHIN, C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 61, 241 (1944).

³ L. EMERIQUE-BLUM et A. LWOFF, Bull. Soc. chim. biol. Paris 22, 179 (1940).

⁴ H. G. K. WESTENBRINK, E. P. STEYN PARVÉ, A. C. VAN DER LINDEN and W. A. VAN DEN BROEK, Z. f. Vitaminforschung 13, 218 (1943).

¹ W. J. ROBBINS, Bull. Torrey Bot. Club 65, 267 (1938).

² E. GUYÉNOT, Bull. Biol. France Belgique, 1917, 51. Thèse sciences, Paris (1917).

³ E. G. VAN 'T HOOG, Z. f. Vitaminforschung 4, 300 (1935).

⁴ R. J. WILLIAMS, J. Biol. Chem. 38, 465 (1919).

⁵ E. E. SNELL and F. M. STRONG, Ind. and Engin. Chem., vol. 11, n° 6, p. 346.

pas complètement synthétique. Aux constituants connus doivent être ajoutées, entr'autre, une peptone photolysée (privée de lactoflavine!) ainsi qu'un extrait de

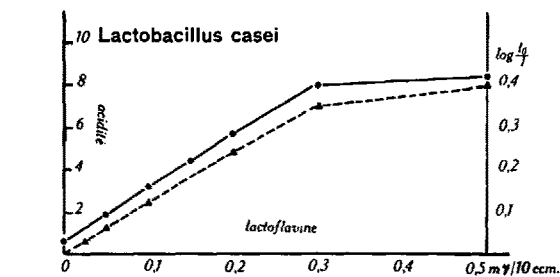


Fig. 10. Développement de *Lactobacillus casei* en présence de doses croissantes de lactoflavine. En trait plein, détermination de l'acidité indiquée par le nombre de ccm. de NaOH n/10 nécessité pour la neutralisation. En pointillé: détermination photométrique, log I₀/I. (D'après SNELL et STRONG, Ind. and Engin. Chem., vol. 11.)

levure. La peptone devrait pouvoir être remplacée par un ensemble d'acides aminés (voir fig. 10). Le tableau dans lequel sont reportées les données de SNELL et STRONG fournies par la néphélométrie et l'acidimétrie (acide lactique) indiquent la précision de la méthode:

Tableau 7

Acidimétrie			Néphélométrie		
Lactoflavine en γ/ccm			Lactoflavine en γ/ccm		
ajoutée	trouvée	%	ajoutée	trouvée	%
0,0198	0,0201	101,5	0,013	0,13	100
0,071	0,074	104,2	0,064	0,063	98,4
0,252	0,251	99,6	0,236	0,225	95,5
0,672	0,685	100,9	0,55	0,59	107
2,20	2,10	95,5	1,97	2,00	101,5

Le tableau 8 indique la concordance entre les résultats fournis par le test microbiologique et le test animal (rat). Divers produits ont été analysés simultanément avec les deux méthodes. Les résultats sont indiqués en γ/g sec.

Tableau 8

<i>L. casei</i>	24,4	24,1	22,6	23,9	31,2
Rat	20	25	22	20	35

<i>L. casei</i>	17,1*	39,2*	34,7*	149,6*	31,8*
Rat	17	37	34,4	145,6	32

* Méthode directe. — Les autres chiffres sont obtenus à partir d'extraits.

On voit donc que ce test, qui est susceptible de diverses modifications, est digne de confiance.

Acide nicotinique. FILDES¹ fait en 1938 l'importante observation que l'acide nicotinique est facteur de croissance essentiel pour *Proteus vulgaris*. Sur la base de cette découverte, A. LWOFF et ses collaborateurs^{2,3} ont mis au point un test excellent pour la détermination de l'acide nicotinique et la nicotinamide. La courbe d'étalonnage (fig. 11) indique la proportionnalité entre la dose de vitamine et le développement correspondant. La méthode, très spécifique, est applicable au sang, à l'urine et au lait.

Il faut ajouter que *P. vulgaris* réagit non seulement à la présence d'acide nicotinique et de nicotinamide, mais aussi à celle de coenzyme I (diphosphopyridino-nucléotide) et de coenzyme II (triphosphopyridino-nucléotide) qui possèdent la nicotinamide comme groupe actif.

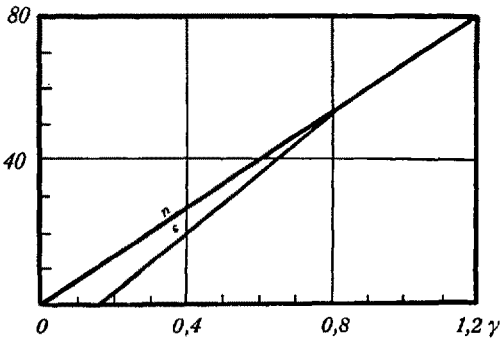


Fig. 11. Courbe d'étalonnage de *Proteus vulgaris*. n: en fonction de la concentration de la nicotinamide dans le milieu synthétique simple. s: en présence de sang. Sur l'abscisse: dose de nicotinamide en γ pour 100 ccm. Sur l'ordonnée, densité optique exprimée en degrés de l'électrophotomètre de MEUNIER. (D'après QUERIDO, LWOFF et LATASTE, in M. Morel, 1943³.)

D'autres tests ont été proposés, qui sont moins pratiques, en particulier *Shigella dysenteriae* (DORFMAN, KOSER, HORWITT, BERKMAN et SAUNDERS⁴), *Shigella paradysenteriae* (FRASER, TOPPING et SEBRELL⁵) et *Lactobacillus arabinosus* (SNELL et WRIGHT⁶). Ils ne présentent pas les avantages du test *Proteus*: milieu très simple, courbe d'étalonnage constante, ne devant pas être établie pour chaque expérience.

Adermine (vitamine B₆). *Streptobacterium plantarum*, étudié par MÖLLER qui, le premier, montra l'importance de l'adermine (= pyridoxine) comme facteur de croissance microbien, pourrait être utilisé. LANDY

¹ P. FILDES, Brit. J. Exp. Pathol. 29, 239 (1938).
² A. LWOFF et A. QUERIDO, C. R. Soc. Biol., Paris 129, 1039 (1938); 130, 1569 (1939). A. LWOFF, Semaine des Hôpitaux, Paris 17, 749 (1941).
³ Melle M. MOREL, L'acide nicotinique facteur de croissance pour «*Proteus vulgaris*». Monographies de l'Institut Pasteur, Paris, Masson (1943).
⁴ A. DORFMAN, S. A. KOSER, M. HORWITT, S. BERKMAN and F. SAUNDERS, Proc. Soc. exp. Biol. 43, 434 (1940).
⁵ H. F. FRASER, N. H. TOPPING and W. H. SEBRELL, Publ. Health Rep. 53, 1836 (1938).
⁶ E. SNELL and L. WRIGHT, J. Biol. Chem. 139, 675 (1940).

et DICKEN¹ utilisent *Lactobacillus casei* pour le test dit des 6 vitamines, permettant de déterminer l'adermine, la lactoflavine, la biotine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique et l'acide folique. R. J. WILLIAMS et ses collaborateurs² proposent *Saccharomyces cerevisiae* (souche « Gebr. Mayer ») en affirmant qu'il s'agit du meilleur test pour la vitamine B₆. Des travaux étendus ne semblent pas avoir été effectués avec ces tests.

On a récemment trouvé une série de champignons du genre *Ceratostomella* (FRIES³, ROBBINS et MA⁴), en particulier *Ceratostomella ulmi* (agent de la thylose de l'orme), qui requièrent l'adermine comme facteur essentiel. FRIES suggère d'utiliser ces organismes comme tests pour la détermination de l'adermine. *C. ulmi* manifeste malheureusement des variations de son degré d'hétérotrophie (tout au moins les souches que nous avons utilisées) et fournit des courbes irrégulières. Il peut certainement être utilisé comme test semi-quantitatif, et avec beaucoup de précautions comme test quantitatif, à l'aide duquel nous avons déterminé l'adermine dans divers produits naturels. Nous avons pu montrer que les organes de rats en avitaminose B₆ contenaient moins de vitamine que les rats normaux. La figure 12 indique une courbe obtenue avec de l'adermine pure. *C. multiannulata*, d'après les expériences de FRIES, donne de meilleurs résultats.

Il faut rappeler à cette occasion un test imprévu qui est proposé par BONNER et DORLAND⁵ (1943). *Neurospora sitophila* (champignon Ascomycète) ne requiert pas l'adermine. Après irradiation par les

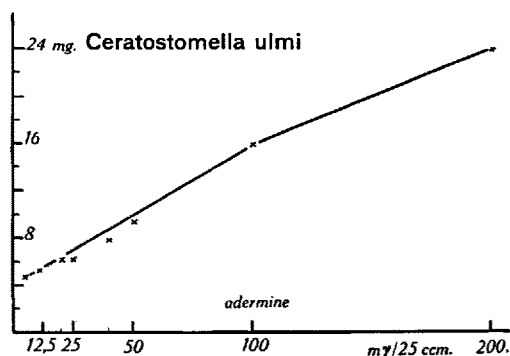


Fig. 12. Développement de *Ceratostomella ulmi* en présence de doses croissantes d'adermine (vitamine B₆). Les contrôles présentent déjà un faible développement, indice d'un début d'auxo-autotrophie. (SCHOPFER, inédit.)

rayons X, il naît un mutant qui a perdu le pouvoir de synthétiser cette vitamine. Il s'agit donc d'une hétérotrophie expérimentale dont le résultat est de

créer une souche déficiente, susceptible de fonctionner comme test semi-quantitatif pour la détermination de l'adermine dans les produits naturels.

Acide pantothénique. *Lactobacillus casei* peut à nouveau être employé (test des 6 vitamines). L'organisme, utilisé selon les prescriptions de STRONG, FEENEY et

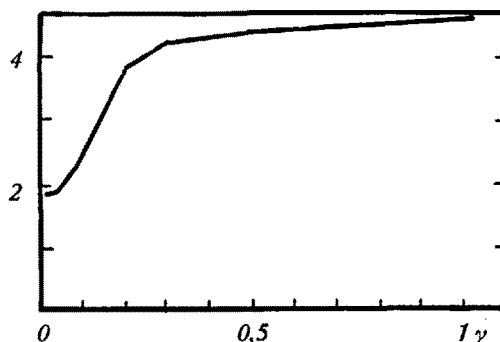


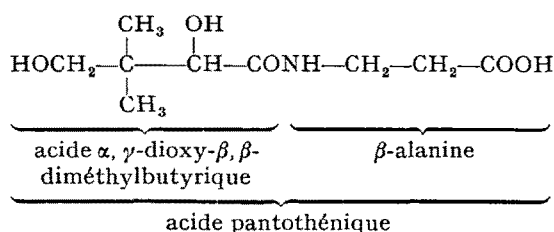
Fig. 13. Développement de *Lactobacillus casei* en présence de doses croissantes de pantothénate de calcium. Sur l'abscisse, doses de pantothénate de Ca en γ pour 10 ccm. Sur l'ordonnée, ccm NaOH n/10. (D'après BURLET¹.)

EARLE², donne de bons résultats (fig. 13) et a permis à BURLET¹ de démontrer la transformation par le microorganisme du pantothénol (γ -oxypropylamide de l'acide 2,4-dioxy-3,3-diméthyl-butyrique) en acide pantothénique. L'élimination urinaire de cette vitamine après administration per os a pu être suivie par BURLET.

D'autres tests ont été proposés: *Streptococcus lactis*, *Bacillus brassicae* et *Propionibacterium pentosaceum* (R. J. WILLIAMS et collaborateurs³, 1940). PELCZAR et PORTER⁴ (1941) ont montré la grande sensibilité de *Proteus Morganii* à l'acide pantothénique. Cette bactérie réagit également à la présence de l'un des constituants de cette vitamine, l'acide α , γ -dioxy- β , β -diméthylbutyrique.

β -alanine. Cet acide aminé est un constituant de l'acide pantothénique. WILLIAMS et ROHRMAN⁵ (1936)

Tableau 9



¹ M. LANDY and D. M. DICKEN, J. of Lab. and Clin. Med. 27, 1086 (1942).

² R. J. WILLIAMS, R. E. EAKIN and J. R. McMAHAN, Univ. Texas Publ., n° 41 037, 22 (1941).

³ N. FRIES, Naturwiss. 30, 685 (1942). Symbolae botan. Upsalienses, VII:2 1—73 (1943).

⁴ W. J. ROBBINS and R. MA, Bull. Torrey bot. Club 69, 184 (1942).

⁵ J. BONNER and R. DORLAND, Arch. Biochemistry (U.S.A.) 2, 451 (1943).

¹ E. BURLET, Z. f. Vitaminforschung 14, 318 (1944).

² STRONG, FEENEY and EARLE, Ind. and Engin. Chem. 13, 566 (1941).

³ H. K. MITCHELL, H. H. WEINSTOCK, E. E. SNELL, S. R. STANBURY and R. J. WILLIAMS, J. Amer. chem. Soc. 62, 1776, 1779, 1785, 1791 (1940).

⁴ M. J. PELCZAR and J. R. PORTER, J. Biol. Chem. 139, 111 (1941).

⁵ R. J. WILLIAMS and E. ROHRMAN, J. Amer. Chem. Soc. 58, 695 (1936).

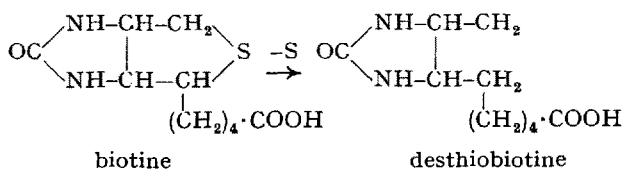
l'indiquent comme facteur de croissance pour la levure. On sait aujourd'hui qu'il fonctionne comme précurseur de l'acide pantothénique pour un organisme qui est capable de synthétiser l'autre moitié. C'est en particulier le cas pour *Corynebacterium diphtheriae*.

NIELSEN et HARTELIUS¹ utilisent une souche de levure pour la détermination de cette vitamine. La précision de la méthode est de l'ordre de 25%. 0,13 γ de la substance peuvent encore être déterminés.

Biotine (vitamine H). Cette vitamine, constituant essentiel de l'ancien « bios » consacre définitivement l'importance du test microbiologique. Nous ne possédons actuellement aucun test chimique pour déceler cette vitamine caractérisée par le fait qu'elle agit sur les microorganismes qui la requièrent à des doses extrêmement faibles. KÖGL et TÖNNIS², dans un travail classique au cours duquel ils isolent pour la première fois la biotine pure, se servent de la race *M* de *Saccharomyces cerevisiae* pour apprécier l'activité de ce facteur de croissance. L'unité *Saccharomyces* est la quantité de biotine requise, dans des conditions bien déterminées, pour produire un accroissement de +100% d'une culture. L'unité *Saccharomyces*, dans les conditions utilisées par KÖGL et TÖNNIS équivaut à $1/25\,000 \gamma$, soit 0,040 mg .

Une méthode pratique a été mise au point par SNELL, EAKIN et WILLIAMS³ (1940) avec la levure. Le milieu de base est réellement synthétique et contient toutes les vitamines requises par l'organisme, dont la constellation de facteurs de croissance est complexe, sauf la biotine (fig. 14). La méthode permet de déceler encore 0,2 $\text{mg}/100 \text{ ccm}$, avec une grande précision, et nous a permis de faire une étude détaillée du métabolisme de la biotine chez *Phycomyces* et d'autres microorganismes. La levure réagit également à la présence de la desthiobiotine (biotine désulfurée). Elle est donc capable de sulfurer la biotine, ce qui n'est pas le cas pour *Lactobacillus casei*. (DITTMER, MELVILLE et du VIGNAUD⁴).

Tableau 10



(DITTMER, MELVILLE et du VIGNAUD⁴, GRÜSSNER, BOURQUIN et SCHNIDER⁵)

Cette méthode a été un instrument important au cours de la synthèse de cette vitamine.

NIELSEN et HARTELIUS¹ ont décrit une méthode utilisant la levure et permettant de déterminer 0,13 mg de vitamine avec une exactitude approximative de 10%. Ces auteurs ont également proposé *B. radicola* dont les besoins en biotine ont été établis par WEST et WILSON² (1939) et NILSSON, BJÄLFVE et BURSTRÖM³ (1939). Cet organisme est encore plus sensible que la levure et que *Candida Guilliermondii*, mais la méthode n'est pas très précise.

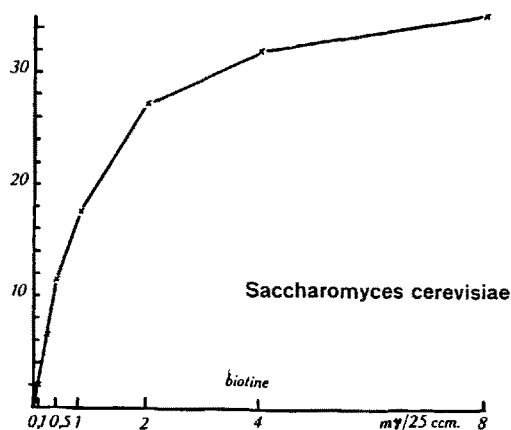


Fig. 14. Développement de *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de doses croissantes de biotine (vitamine H). Sur l'ordonnée, absorption de lumière en %. (SCHOPFER, inédit.)

Acide p-aminobenzoïque. Cette vitamine, récemment mise en évidence, pourrait être dosée à l'aide d'une souche particulière de *Neurospora sitophila* rendue hétérotrophe pour cette vitamine par irradiation aux rayons X (TATUM et BEADLE). Nous ignorons si cette méthode a été étudiée.

Méso-inositol. Ce facteur, auquel WOOLLEY⁴ attribue la qualité de vitamine antialopécique, fait également partie de la constellation requise par la levure et d'autres microorganismes. Elle agit généralement comme facteur complémentaire. WOOLLEY⁵ (1941) ainsi que WILLIAMS⁶ proposent la levure comme organisme-test.

Acide folique. Ce facteur de croissance, encore insuffisamment connu, présent dans les feuilles, fut mis en évidence par Williams et ses collaborateurs. Il est, selon ces biologistes, facteur essentiel pour *Streptococcus lactis* R. (= *S. faecalis* R.). On attribue à ce

¹ N. NIELSEN und V. HARTELIUS, C. R. Trav. Lab., Carlsberg 23, 259 (1941).

² F. KÖGL und B. TÖNNIS, Z. Physiol. Chem. 242, 43 (1936).

³ E. SNELL, R. E. EAKIN and R. R. WILLIAMS, J. Amer. Chem. Soc. 62, 175 (1940).

⁴ K. DITTMER, D. B. MELVILLE and V. DU VIGNAUD, Science 99, 203 (1944).

⁵ A. GRÜSSNER, J. P. BOURQUIN und O. SCHNIDER, Helv. chim. Acta 28, 517 (1945).

¹ N. NIELSEN und V. HARTELIUS, C. R. Trav. Lab., Carlsberg 23, 387 (1942).

² P. M. WEST and P. W. WILSON, Enzymologia 8, 152 (1939).

³ R. NILSSON, G. BJÄLFVE und D. BURSTRÖM, Naturwiss. 27, 389 (1939).

⁴ D. W. WOOLLEY, J. Biol. Chem. 39, 29 (1941).

⁵ D. W. WOOLLEY, J. Biol. Chem. 140, 453 (1941).

⁶ R. J. WILLIAMS, A. K. STOUT, H. K. MITCHELL and J. R. Mc MAHAN, Univ. Texas Public., n° 4137, 27 (1941).

facteur, qui semble très répandu, la formule empirique $C_{15}H_{15}O_8H_5$. Il peut être déterminé quantitativement à l'aide de l'organisme ci-dessus.

Le titre de cet article imposait une description succincte, un peu sèche peut-être, des principaux tests. Il ne s'agit que d'un choix comprenant les méthodes les plus utilisées et les plus sûres. Elle aura suffi pour donner au lecteur une idée de l'importance de l'instrument excellent que constitue le test microbiologique et des possibilités d'applications pour ainsi dire illimitées. Instrument délicat et précis, mais vivant, c'est-à-dire parfois capricieux, qu'il faut sans cesse contrôler et qui ne doit pas être traité comme un réactif chimique.

La discussion d'un problème général, de grande importance, et à l'étude duquel les tests microbiologiques contribuent d'une manière éminente, nous permettra de sortir du cadre limité des techniques.

Les facteurs de croissance vitaminiques du sol

Leur existence dans le sol

Depuis longtemps, on a fait l'observation que des extraits bruts de terre sont favorables au développement de certains microorganismes *in vitro*. On songe tout naturellement à un aliment carboné ou azoté apporté par l'extrait aqueux de sol. Cela n'est certes pas impossible, mais ne nous explique pas cette action parfois si favorable. PRINGSHEIM¹ pose nettement la question (1935): Wuchsstoffe im Erdboden? La même année, LWOFF et LEDERER² observent qu'un Flagellé, *Polytomella agilis* est favorisé dans son développement par des extraits de terre, dans des conditions culturelles telles qu'il faut songer à une action de facteur de croissance, plutôt qu'à un effet de l'humus.

Mon ancien collaborateur W. F. MÜLLER³ fait en 1937 les observations suivantes avec *Mucor Ramannianus* dont on sait qu'il est auxo-hétérotrophe et requiert le thiazol de l'aneurine comme facteur de croissance. Il s'agit d'une Mucorinée typique du sol. MÜLLER récolte de la terre dans le sol d'une forêt qui n'a certainement jamais reçu d'engrais. Ce sol est tamisé, les fragments de racine sont enlevés aussi complètement que possible. Un extrait aqueux est préparé par chauffage à 100° C, qui est ajouté à des milieux synthétiques pour *M. Ramannianus*. Avec 1,5 γ d'aneurine, on obtient un poids sec de culture de 200 mg environ. Avec l'extrait de 40 g de terre, les résultats suivants sont obtenus:

Tableau 11

Sol de 1 à 3 cm au-dessous d'une couche d'aiguilles de Conifères	28,5 mg (poids sec de <i>M. Ramannianus</i>)
de 6 à 8 cm	18,0 mg
de 12 à 15 cm	4,5 mg
contrôles	0

Le milieu de culture contient en doses optimales tout ce qui est nécessaire à la croissance du microorganisme. Il ne peut donc s'agir d'une action plastique ou énergétique ordinaire, mais bien d'une action de facteur de croissance vitaminique. Celui-ci peut être adsorbé par le noir animal et élué par un mélange alcool-HCl n/10. Le facteur ainsi obtenu est soluble dans l'eau, l'alcool mais pas dans le chloroforme (ce qui exclut le thiazol de l'aneurine). Il ne peut s'agir que de l'aneurine. L'effet observé avec le sol provenant de 1–3 cm de profondeur correspond environ à 0,05 γ de vitamine B₁.

Depuis cette époque, nous avons fait un grand nombre d'observations à l'aide de sols divers, d'engrais naturels, d'engrais naturels industriels. Nous y avons régulièrement retrouvé des doses variables, mais souvent appréciables d'aneurine, de biotine, d'adermine (vitamine B₆). Lorsqu'il s'agit du sol, c'est toujours la partie voisine de la surface qui est la plus riche. Nous retrouvons de l'aneurine et de la biotine dans l'eau d'un marécage.

BONNER et GREENE¹ (1938), trouvent à l'aide du test *Phycomyces* des quantités appréciables d'aneurine dans plusieurs engrais naturels (0,08–0,13 mg/kg!).

LILLY et LEONIAN² (1939) trouvent dans le sol des doses d'aneurine suffisantes pour permettre le développement de *Phytophthora erythroseptica* (réclamant la molécule complète d'aneurine), de *Phycomyces blakesleeana* (exigeant la pyrimidine et le thiazol), de *Pythiomyces gonapodioides* (demandant la pyrimidine seule), de *Mucor Ramannianus* ainsi que de *Sordaria fimicola*, dont on soupçonne le besoin en biotine.

Récemment, CARPENTER³ trouve de la lactoflavine dans le sol, en quantité proportionnelle à la dose de matière organique présente et LOCHHAED et CHASE (1943) soupçonnent la présence dans le sol de facteurs essentiels autres que l'aneurine, la biotine, la lactoflavine, l'adermine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique et le méso-inositol.

Il nous paraît tout naturel que le sol contienne des facteurs de croissance actifs sur *B. radicola* (NIEL-

¹ E. G. PRINGSHEIM, Naturwiss. 23, 197 (1935).

² A. LWOFF et E. LEDERER, C. R. Soc. Biol. Paris 119, 971 (1935).

³ W. F. MÜLLER, Thèse Berne, Ber. Schweiz. bot. Ges. 51, 165 (1941).

¹ J. BONNER and J. GREENE, Bot. Gaz. 100, 226 (1938).

² V. G. LILLY and L. H. LEONIAN, Science 89, 292 (1939).

³ C. C. CARPENTER, Science 98, 109 (1943).

SEN¹). On sait que ce microorganisme qui, du sol, pénètre dans les racines de Papillonacées et y forme les nodosités bactériennes, exige en tous les cas la biotine pour sa croissance.

La présence de phyto- et zooplancton dans l'eau des lacs rend des plus plausibles l'observation de HUTCHINSON² (1943) qui retrouve de l'aneurine dans l'eau lacustre non filtrée (de 1,03 à 1,2 γ par litre) ainsi que des traces de biotine. La présence de ces facteurs de croissance dans les organismes planctoniques est toute naturelle.

Nos premières observations sont donc confirmées: *il y a bien des vitamines dans le sol.*

Origine des facteurs vitaminiques du sol

Lorsque nous parlons de vitamines du sol, il ne faut pas se faire d'illusions: l'effet auxogène observé ne repose pas uniquement sur les vitamines extracellulaires, diffusées ou libérées de microorganismes, mais aussi des facteurs extraits des organismes mélangés à la terre et qui ne peuvent être séparés de cette dernière³. *Azotobacter* sp. contient d'après BONNER et GREENE (1938) 140 mg d'aneurine/kg et en général, les autres microorganismes étudiés, autotrophes pour l'aneurine en contiennent des quantités élevées. Il en est de même pour la biotine, l'adermine et probablement d'autres vitamines. Si l'on songe qu'in vitro, des champignons filamenteux tels que *Phycomyces*, *Rhizopus* divers, dont nous avons montré le pouvoir de synthèse pour la biotine, laissent diffuser 80–90% de leur production dans le milieu, on peut admettre qu'il en est de même dans le sol. Il faut cependant se rappeler que les conditions de culture y sont en général infiniment moins favorables qu'in vitro.

Le tableau 12 se rapportant au sol d'un champ ayant reçu du fumier (ROTHAMSTED), indique par gramme de sol, le nombre de microorganismes présents:

Tableau 12

	Nombre	Poids approximatif en kg./Ha, couche sup. de 15 cm.
Amibes	150 000 à 280 000	76 à 134
Flagellés	350 000 à 770 000	56 à 112
Ciliés	100 à 1 000	—
Bactéries	1 · 10 ⁸ à 5 · 10 ⁹	1680 à 8400
Algues (sauf Cyanophycées)	> 100 000	> 139

(d'après E. JOHN RUSSEL⁴)

¹ N. NIELSEN, C. R. Trav. Lab., Carlsberg 24, 66 (1944).

² G. E. HUTCHINSON, Arch. Biochem. (U.S.A.) 2, 143 (1943).

³ Nous ne pouvons actuellement pas donner de plus amples détails à ce sujet.

⁴ E. J. RUSSEL, Boden und Pflanze, 2. Auflage, Steinkopf, Dresden und Leipzig (1936).

FEHER¹, étudiant le sol naturel de diverses forêts, indique les chiffres extrêmes suivants:

Tableau 13

Champignons	Bactéries (totales)	Rapport: bactéries/champignons
280 000	44 800 000	160
354 000	4 900 000	13,9
20 000	7 700 000	385
540 000	31 000 000	57,9

(d'après FEHER, in A. RIPPEL²)

On peut se représenter que ces organismes, développés ou latents, représentent des sources importantes de facteurs de croissance vitaminiques. Il peut s'agir, soit d'une diffusion à partir des organismes vivants, soit d'une libération par désintégration de cadavres microbiens.

Il faut d'autre part envisager la plante supérieure comme productrice de facteurs vitaminiques. La croissance de *Mucor Ramannianus* est favorisée par des dialysats naturels de racine ou de semences de Conifères. Ceux-ci, comme MÜLLER l'a montré, n'agissent pas d'une manière spécifique, mais uniquement par l'aneurine qui a diffusé des tissus vivants (SCHOPFER³). Nous avons montré en 1936 que des dialysats de pollen, d'organes floraux et de feuilles activent la croissance de *Phycomyces* en milieu synthétique⁴. Ils doivent obligatoirement contenir de l'aneurine, qui a diffusé des tissus vivants. Peut-on en inférer qu'il en est de même dans la nature? L'affirmation doit être faite avec prudence. Quelques expériences, faites à l'aide de cultures stériles, sur sable, nous ont montré qu'il y a effectivement, à partir de la racine vivante, une diffusion de facteurs de croissance vitaminiques.

Des expériences indirectes parlent également en faveur d'une diffusion. STILLE⁵ (1938) inocule une culture stérile de Moutarde avec *B. mesentericus* et des levures rouges. Après 5 jours il observe dans le voisinage immédiat des racines une accumulation des microorganismes inoculés (voir fig. 15) qui ne peut s'expliquer que par une action des racines. Malgré l'opinion d'ISAKOVA⁶ (1937), il ne semble pas qu'il s'agisse d'une association spécifique entre les racines

¹ D. FEHER, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens, Springer, Berlin (1933).

² A. RIPPEL, Mikrobiologie des Bodens, Hdbch. der Bodenlehre, 1. Ergänzungsband, Springer, Berlin (1939).

³ W. H. SCHOPFER, C. R. Soc. Physique Hist. nat., Genève, 49, 155 (1932).

⁴ W. H. SCHOPFER, Arch. f. Mikrobiol. 7, 156 (1936).

⁵ B. STILLE, Arch. f. Mikrobiol. 9, 477 (1938).

⁶ A. A. ISAKOVA, in RIPPEL, Mikrobiologie des Bodens (1939).

de la plante supérieure et des microorganismes introduits.

D'ailleurs, les statistiques de THOM et HUMFELD¹ (1932), montrent que dans le voisinage des racines,

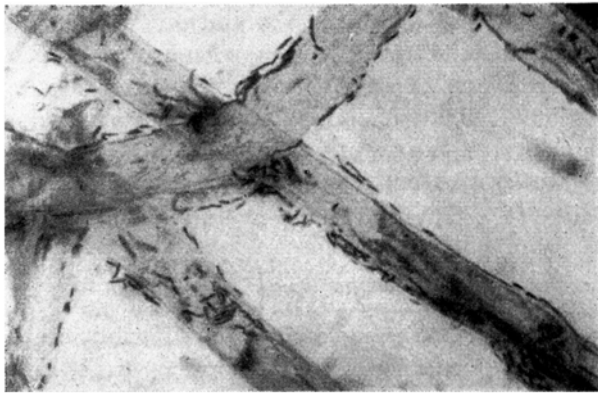


Fig. 15. Rhizosphère de Moutarde, 5 jours après une infection artificielle de la culture stérile avec *Bacillus mesentericus*. (D'après STILLE, Arch. f. Mikrobiol., 1938.)

le nombre de microorganismes est nettement plus élevé (voir tableau 14). Il s'agit du maïs et le nombre des organismes est rapporté à 1 g de terre.

Tableau 14

	Champignons	Bactéries	pH
Sol	100 000	5 500 000	4,8
Sol en contact avec les racines . . .	800 000	26 000 000	5,2

KRASSILNIKOV² affirme avoir trouvé *B. denitrificans* et *B. fluorescens* bien développés dans la rhizosphère du blé et du maïs.

Il existe par contre une autre source de facteurs vitaminiques pour le sol, indiscutable celle-là: ce sont les végétaux se décomposant à la surface du sol. Une couche de feuilles, laissées à la surface du sol, à l'action des intempéries, détermine un enrichissement en facteurs de croissance de la couche immédiatement en contact avec le matériel en décomposition. Ces facteurs de croissance sont libérés par la matière morte elle-même, par les microorganismes à qui elle sert de substrat, et qui, peut-être, réclament eux-mêmes des facteurs de croissance.

Ceci vaut également pour la matière animale et les excréta animaux. Les fèces animales et humaines

¹ C. THOM and H. HUMFELD, J. Bact. 23, 79 (1932). Soil Sc. 34, 29 (1932).
² N. A. KRASSILNIKOV, Microbiology 3, 343 (1934) in RIPPET, Microbiologie des Bodens (1939).

contiennent des quantités appréciables d'aneurine. L'excrétion urinaire de vitamine, chez un individu normalement nourri, au cours de 24 heures, est de l'ordre de 30–90 γ (WESTENBRINK et GOUDSMIT) et de 100 γ selon W. KARRER. Directement ou non, cette vitamine retourne partiellement au sol.

Absorption des facteurs par la plante

Une autre question, se rapportant de nouveau à un problème presque'inexploré, se pose. La présence de facteurs de croissance vitaminiques dans le sol étant acceptée, peut-on admettre que les racines des plantes supérieures sont en état de les absorber? L'absorption par la racine de substances organiques me semble indiscutable quoiqu'elle soit encore contestée et très peu étudiée.

Si, à une culture stérile de plante supérieure sur milieu liquide, nous ajoutons de l'aneurine, celle-ci, en excès peut être retrouvée dans les feuilles à l'aide du test *Phycomyces*. BONNER et GREENE ont démontré qu'il en était de même si l'on ajoutait de la vitamine B₁ au sol. Il faut que la molécule de vitamine, à vrai dire pas très complexe, ait pénétré par les poils radiculaires.

L'absorption par les racines des facteurs vitaminiques du sol, pour autant que ceux-ci soient libres et transportables par l'eau de circulation, est certainement possible.

D'autre part, il ne faut pas oublier les anciennes recherches de BOTTOMLEY, relatives aux «auximones», faites entre 1914 et 1918, à une époque où la question des vitamines n'était pas encore introduite en physiologie végétale. Des extraits de tourbe bactérisée agissent favorablement, non seulement sur les microorganismes fixateurs d'azote (*B. radicola*, *Azotobacter chroococcum*, mais aussi sur les plantes supérieures. Il s'agissait à vrai dire de végétaux aquatiques tels que *Lemna minor*, *Azolla filiculoides*, *Salvinia natans*, *Limnobium stoloniferum*.

Action des vitamines ajoutées au sol

On ne peut envisager ce problème sans aborder la question très discutée de l'action des vitamines, particulièrement celle de l'aneurine, ajoutée à l'eau d'arrosage. Entreprise sur des bases scientifiques par BONNER et GREENE¹ (1938), cette étude a fourni des résultats encourageants. Avec 0,01 mg d'aneurine par litre une accélération très nette du développement est observée

¹ J. BONNER and J. GREENE, Bot. Gaz. 100, 226 (1938).

avec *Bougainvillea glabra*, *Arbutus unedo*, *Eucalyptus ficifolia*. Avec *Ceratonia siliqua* en culture sur sable, la croissance est augmentée de +100%. Malheureusement ces résultats ont été transportés immédiatement dans le domaine de la pratique et les échecs ont été nombreux. Il est fort probable que seules certaines plantes réagissent à la vitamine ajoutée au sol. Il est très possible également que ce ne soit pas la plante supérieure qui soit directement influencée par la vitamine, mais bien la flore microbienne, contenant aussi des microorganismes hétérotrophes pour l'aneurine. Par là, indirectement, la croissance de la plante supérieure peut être avantagée. Une telle action doit dépendre également de la nature et de la composition du sol. A quoi sert une adjonction de vitamine au sol, si celui-ci en est déjà riche? Elle peut même être dangereuse du point de vue phytopathologique, si l'adjonction de vitamine B₁ favorise, directement ou non, le développement d'un parasite néfaste. PRYOR¹ (1942) affirme avoir observé un tel cas avec le Cantaloux parasité par *Erysiphe cichoracearum*.

A notre avis, toute la question de l'action de l'aneurine ajoutée à l'eau d'arrosage est à reprendre sur de nouvelles bases.

Action des qualités du sol et des engrais sur le taux en vitamine des plantes

Nous avons jusqu'ici envisagé uniquement le taux en vitamine du sol et l'action possible de celles-ci sur la croissance des plantes. Le problème présente un autre aspect. De quelle manière la nature chimique du sol, particulièrement les engrais, agissent-ils sur le taux en vitamines des végétaux supérieurs? SCHEUNERT, une autorité en la matière, déterminant les taux en vitamines à l'aide du test animal, a toujours affirmé que, dans une large mesure, les engrais n'agissaient pas d'une manière notable sur les taux en vitamines. Récemment, BURKHOLDER et McVEIGH², utilisant le test *Phycomyces*, démontrent qu'un engrais azoté élève le taux en aneurine, tandis que l'engrais phosphoré le diminue. HURNI³, dans une étude très détaillée sur *Melandrium album* arrive aux mêmes conclusions (fig. 16).

Le problème que nous exposons ici en est à ses débuts. Ce sont surtout les incertitudes qui frappent.

En nous résumant, nous pouvons tout de même énumérer les faits acquis:

1° il y a des facteurs de croissance vitaminiques dans le sol;

2° ces facteurs sont produits par les microorganismes du sol, desquels ils diffusent, du matériel végétal et animal en décomposition. Ils sont apportés par les engrais naturels;

3° la plante supérieure est capable d'absorber certaines vitamines avec l'eau qu'elle retire du sol.

«Cycle» de facteurs de croissance

Ces faits étant admis et démontrés, il paraît évident que, par le canal des facteurs de croissance vitaminiques, des relations s'établissent entre les divers types

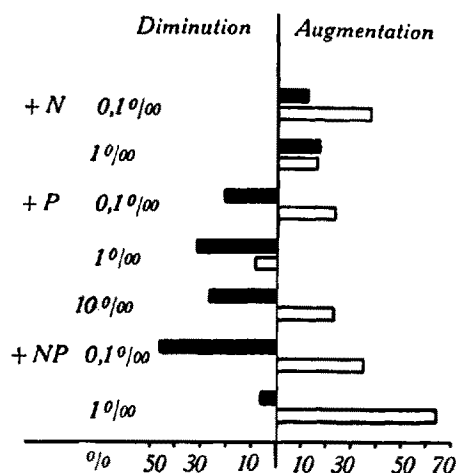


Fig. 16. Augmentation et diminution relative du taux en aneurine de *Melandrium album* en fonction de l'engrais azoté (N), phosphoré (P) et azoté-phosphoré (NP), par rapport aux contrôles. En noir: cultures sur terre ordinaire. En blanc: cultures sur sable. (D'après HURNI¹.)

physiologiques de microorganismes du sol. Certains d'entre eux sont auxo-autotrophes, d'autres auxo-hétérotrophes. LOCHHEAD et CHASE² (1943) relèvent que 19% des microorganismes isolés d'un sol déterminé exigent un facteur essentiel différent de l'aneurine, de la biotine, de l'adérmine, de l'acide pantothénique, de l'acide nicotinique et du méso-inositol. Le filtrat de cultures d'autres microorganismes, croissant sur un milieu synthétique simple, contient ce facteur essentiel pour les auxo-hétérotrophes. On voit donc comment les relations et les dépendances peuvent s'établir, s'exprimant par des stimulations unilatérales et des métabioses.

Nous avons admis un vaste cycle, basé uniquement sur les besoins et les productions de facteurs vitaminiques. A vrai dire, la notion de cycle présuppose l'existence d'un élément chimique indestructible (C, N, S, Ca, etc.) dont nous suivons le passage au travers des divers métabolites synthétisés par une

¹ D. E. PRYOR, *Phytopathology* 32, 14 (1942).

² P. BURKHOLDER and I. McVEIGH, *Amer. J. Bot.* 27, 853 (1940).

³ H. HURNI, Thèse Berne, *Z. f. Vitaminforschung* 15, 198 (1944).

¹ H. HURNI, Thèse Berne, *Z. f. Vitaminforschung* 15, 198 (1944).

² A. G. LOCHHEAD and F. E. CHASE, *Soil Sc.* 55, 185 (1943).

chaîne d'organismes. C'est donc par extension que nous appliquons ici la notion de cycle. L'idée a été suggérée également par BOAS et KÖGL. Nous avons tenté de la concrétiser de la manière qu'indique la figure 17. Les plantes vertes sont douées de tous les pouvoirs de synthèse et fabriquent les vitamines qu'elles livrent aux animaux qui sont, dans leur plus grande majorité, auxo-hétérotrophes. Chez l'animal comme chez la plante verte dont les pouvoirs de synthèse sont temporairement diminués ou supprimés, des symbiontes auxo-autotrophes fournissent les vitamines nécessaires au maintien et au développement. La décomposition des animaux et des plantes vivant sur le sol livrent à ce dernier des facteurs vitaminiques dont

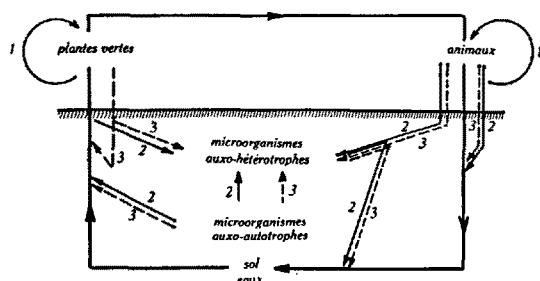


Fig. 17. Cycle illustrant les relations directes et indirectes entre les différents types physiologiques de microorganismes. 1. Présence de microorganismes symbiotiques. 2. Facteurs vitaminiques diffusant d'organismes vivants. 3. Facteurs produits et libérés par les organismes morts, en décomposition. (Modifié d'après SCHOPFER¹, *Plants and Vitamins*, 1943.)

profitent les microorganismes auxo-hétérotrophes. Ceux-ci, de même que leurs congénères auxo-autotrophes, restituent à nouveau au sol des facteurs vitaminiques dont, éventuellement, la plante supérieure peut profiter.

A vrai dire, ce «cycle» n'est pas fermé. Nous connaissons ses principaux stades dont la réalité est démontrée expérimentalement. Nous ignorons de quelle manière ces différents stades sont exactement réunis. Dans son ensemble, ce cycle, reposant sur quelques données précises, est surtout l'expression d'un vaste plan de recherches, qui doit être poursuivi dans tous ses détails: analyses systématiques des sols en facteurs vitaminiques, établissement des besoins en facteurs de croissance des microorganismes typiques du sol, démonstration de la perméabilité radiculaire pour les

facteurs vitaminiques, nous semblent des tâches pressantes, d'un intérêt pratique et national indiscutable. Elles nous permettront de préciser un facteur nouveau dont le rôle dans la production végétale nous paraît évident.

Nous avons, dans le cadre limité de cet article, envisagé le problème des facteurs de croissance du sol pour lui-même. Il tombe sous le sens qu'il ne constitue qu'un élément d'un problème plus vaste, en fonction duquel il doit être étudié: celui de la production végétale en fonction du sol et de ses microorganismes.

Nous dirons simplement en concluant: «l'équilibre» régnant entre les végétaux terrestres et les microorganismes du sol est le produit de synergismes et d'antagonismes dont la base matérielle est représentée par des substances émises et diffusant. Les facteurs de croissance vitaminiques que l'on a négligés jusqu'à maintenant représentent une catégorie de ces substances.

Nous ne devons pas oublier que toutes nos expériences de laboratoire se font dans des conditions artificielles. Toutes les données acquises au laboratoire doivent finalement être transportées dans la nature, car la fin dernière de toute recherche est d'expliquer le comportement des êtres vivants dans la nature. C'est ainsi que nous arriverons à une sorte de vitaminologie écologique.

Summary

The qualities required by a microorganism to work as test object are studied, so as the utilized methods to measure development.

The different, watersoluble vitamins from the group B: thiamin, riboflavin, nicotinic acid, adermin (pyridoxin), pantothenic acid, β -alanin, biotin, p-aminobenzoic acid, mesoinositol, enable the creation of a useful test with a selected microorganism.

The problem of the vitaminic factors of the soil is one of those which can only be studied with help of microbiological tests. The presence of vitamins in the soil is proved. Their origin is discussed. Their action and that of vitamins voluntarily added to the soil is studied. It is shown that the qualities of soil and manures have a marked influence on the thiamin rate of the studied plant.

A cycle is suggested to show how the action of growth factors enable to understand the natural relations existing between the auxo-heterotrophic and the auxo-autotrophic organisms. The growth factors of the soil participate to the biological balance ruling life in and on the soil. The necessity of an "ecological vitaminology" is being considered.

¹ W. H. SCHOPFER, *Plants and Vitamins*, New Series of Plant science Books, vol. XI, Waltham U.S.A., 300 pp. (1943).