

BACTÉRIES ANAÉROBIES DES LACS DU RUWENZORI

PAR

ANDRÉ-ROMAIN PRÉVOT (Paris)

Des 24 prélèvements rapportés par H. MOLLARET en 1956 de la première mission au Ruwenzori, 32 souches anaérobies ont été isolées et déterminées par M^{me} DE CADORE et M^{lle} THOUVENOT.

Elles appartenait à 9 espèces différentes. Pour leur répartition géographique nous éliminons tout de suite les 4 prélèvements faits sur le glacier Stanley, tous stériles.

Les 5 prélèvements du lac Marion ont fourni 8 souches appartenant aux espèces *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris* et *Clostridium saccharobutyricum*.

Les 4 prélèvements du lac Noir ont fourni 6 souches appartenant aux espèces *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*, *Clostridium caproicum*, *Cl. acetobutyricum*.

Les 3 prélèvements du lac Blanc ont fourni 3 souches appartenant aux espèces *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*, *I. barati*.

Les 2 prélèvements du lac Gris ont fourni 5 souches appartenant aux espèces *Inflabilis lacustris*, *Clostridium caproicum*, *Inflabilis magnus* et *Clostridium regulare*.

Les 2 prélèvements du lac Catherine ont donné 3 souches appartenant aux espèces *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris* et *Plectridium fluxum*.

Les 2 prélèvements du lac Vert ont fourni 3 souches appartenant aux espèces *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*.

Le prélèvement du lac Dominique a donné 2 souches *Welchia perfringens* et *Inflabilis lacustris*.

Le prélèvement du lac de la Lune a donné 2 souches *Welchia perfringens* et *Inflabilis lacustris*.

Lac	N° du pré- lèvement	Analyste	Anaérobies déterminés
Blanc supérieur	13/39	THOUVENOT	<i>I. lacustris</i>
Noir	24/40	DE CADORE	<i>I. lacustris</i>
Noir	24/7	SILLIOC	<i>W. perfringens</i>
Noir	24/8	KNELSON	<i>Cl. acetobutyricum, Cl. caproicum</i>
Noir	24/1	SILLIOC	<i>W. perfringens, I. teras</i>
Blanc principal	16/38	DE CADORE	<i>I. barati</i>
Glacier Stanley	14/19	SILLIOC	Stérile
Blanc supérieur	15/16	KNELSON	<i>I. barati</i>
Glacier Stanley	14/32	SILLIOC	Stérile
Gris	18/28	SILLIOC	<i>Cl. caproicum, Cl. regulare, I. magnus, Cl. caproicum</i>
Blanc principal	16/49	THOUVENOT	<i>W. perfringens</i>
Catherine	17/44	THOUVENOT	<i>I. lacustris</i>
Catherine	17/50	PETRIGALLA	<i>Pl. fluxum, W. perfringens</i>
Gris	18/17	SILLIOC	<i>I. lacustris</i>
Vert	12/32	SILLIOC	<i>W. perfringens</i>
Marion	8/30	SILLIOC	<i>W. perfringens</i>
Marion	9/24	PETRIGALLA	Stérile
Glacier Stanley	14/28	SILLIOC	Stérile
Dominique	3/41	KAISER	<i>W. perfringens, I. lacustris</i>
Marion	6/33	KAISER	<i>W. perfringens, I. lacustris</i>
Lune	9/43	KAISER	<i>W. perfringens, I. lacustris</i>
Vert	12/6	KAISER	<i>W. perfringens, I. lacustris</i>
Marion	4/18	SILLIOC	<i>W. perfringens, I. lacustris</i>
Marion	8/7	THOUVENOT	<i>W. perfringens, I. lacustris, Cl. saccharobutyricum</i>

Résumé. — *Welchia perfringens* et *Inflabilis lacustris* constituent la microflore anaérobie obligée des lacs du Ruwenzori. L'espèce *Clostridium caproicum* les accompagne deux fois : deux autres *Inflabilis* y sont successivement présents : *I. barati* et *I. magnus* ainsi que d'autres *Clostridium* et *Plectridium* de moindre importance.

Cette formule est peu différente de celle que A. R. PRÉVOT a détecté dans tous les sols vierges du monde depuis les pôles jusqu'à l'équateur. La différence très marquante est la présence d'*Inflabilis lacustris* qui est vraiment une caractéristique de ces lacs. Notons toutefois que depuis sa description il a été retrouvé dans les matières fécales du Gorille du Congo Belge et dans une semi-conserve de poisson en Tunisie.

RÉCAPITULATION.

Lac Blanc (3) : *Inflabilis lacustris*, *I. barati*, 2 *Welchia perfringens*.
 Lac Noir (4) : *Inflabilis lacustris*, *Welchia perfringens*, *Clostridium aetobutyricum*, *Cl. caproicum*.
 Glacier Stanley (4) : stérile.
 Lac Gris (2) : *Inflabilis magnus*, *I. lacustris*, *Clostridium caproicum*, *Cl. regulare*.
 Catherine (2) : *Inflabilis lacustris*, *Plectridium fluxum*, *Welchia perfringens*.
 Vert (2) : *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*.
 Marion (5) : *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*, *Clostridium saccharobutyricum*.
 Dominique (1) : *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*.
 Lune (1) : *Welchia perfringens*, *Inflabilis lacustris*.

Donc *Welchia perfringens* et *Inflabilis lacustris* partout.

Autres, dans l'ordre décroissant : *Clostridium caproicum*, *Inflabilis barati*, *Clostridium acetobutyricum*, *Inflabilis magnus*, *Clostridium regulare*, *Plectridium fluxum*, *Clostridium saccharobutyricum*.

INSTITUT PASTEUR,
 SERVICE DES ANAÉROBIES (Paris).

UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE DES LACS DU RUWENZORI : *INFLABILIS LACUSTRIS* n. sp. ⁽¹⁾.

Habitat. — La souche 17/44 A a été isolée d'un prélèvement fait le 12 février 1956 dans les sédiments profonds du lac Catherine (altitude, 3.900 m; température de l'eau, 6°1; pH de l'eau, 5). Sur les rives de ce lac croissent uniquement des herbes et des seneçons. La profondeur maximum est de 10 m. Aucun poisson ni autre animal n'y a été observé. Les prélèvements ont été faits au carottier stérilisé extemporanément. L'échan-

(1) Ex *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 91, 1956, par A.-R. PRÉVOT, H. THOUVENOT, M. PATRIGALLA et R. SILLIOC (Paris).

tillon est arrivé à l'Institut Pasteur en mars et gardé à la glacière. L'étude a commencé le 31 mai 1956. La densité microbienne était très marquée. L'espèce étudiée y pullulait à l'état pur.

Les souches 0633 B et 0633 C ont été isolées dans les sédiments prélevés à l'embouchure du torrent alimentant le lac Marion (altitude, 3.685 m; température, 10°); flore : mousse, seneçons, alchémilles, immortelles; faune : damans, léopards, canards; prélèvements faits le 21 janvier 1956. Étude entreprise en juillet 1956. Ces deux souches étaient abondantes dans cet échantillon qui renfermait en outre *Welchia perfringens*.

La souche 0943 B a été isolée de sédiments superficiels d'une petite grève sableuse du lac de la Lune (point D) le 24 janvier 1954; altitude, 3.900 m; température de l'eau, 4°5; pH, 4,5; flore : mousse et seneçons; faune : damans, léopards et chauves-souris. L'étude en a été faite en juillet 1956. La souche y voisinait avec *Welchia perfringens*.

Les souches 1216 B et 1216 C ont été isolées de sédiments prélevés le 10 février 1956 au point J du lac Vert, près du rivage, sous 30 cm d'eau, sur un fond d'aspect en *riffle-marks*, sédiments verts, denses et secs. Altitude, 4.035 m; pH, 4,9; température, 6°; flore : seneçons, carex et immortelles; faune : léopards. Dans l'eau : œufs de batraciens. Elles y coexistaient avec *Welchia perfringens*.

La souche 18-17 a été isolée d'un prélèvement fait le 13 février 1956 dans les sédiments superficiels du lac Gris (altitude, 4.150 m; température de l'eau, 2°6; pH, 4,8). Sur les rives, végétation de lichens, de petits seneçons et d'immortelles; faune : léopards. Mêmes remarques sur le prélèvement et sa conservation. Étude entreprise le 11 juin 1956. Densité microbienne faible. Cette souche était la seule bactérie anaérobie existant dans le prélèvement. Des anaérobies facultatifs en assez grande abondance l'accompagnaient.

Ainsi ces sept souches proviennent de 5 lacs différents mais dont les deux premiers sont alimentés par les eaux du même glacier.

Morphologie. — Bâtonnet de 2 à 4 μ sur 0,8 à 1 μ à extrémités arrondies, immobile, non cilié, non encapsulé, sporulé. Les spores sont en général rares ou invisibles sur les milieux ordinaires. Sur milieu de Ellner (1) elles sont plus abondantes et se montrent centrales ou subterminales dans les formes jeunes, libres dans les formes âgées. Coloration : Gram-positif. Certaines souches montrent des spores abondantes et visibles dans les milieux VF.

Physiologie. — Anaérobie strict stable. La thermorésistance est peu marquée : dix minutes à 80°, cinq minutes à 90°, une minute à 100°. Le pouvoir réducteur est très marqué : il réduit définitivement le rouge neutre et la phénosafranine et temporairement la safranine. Pas de catalase. Les cultures sont gazogènes (gaz explosif) et fétides (odeur âcre et nauséabonde).

Caractères culturaux. — En gélose profonde il donne rapidement des colonies lenticulaires et du gaz. Une souche y donne des colonies ouatées et très peu de gaz. En eau peptonée il donne un léger trouble. En bouillon VF glucosé le trouble est très marqué et le dépôt rapide et abondant. La gélatine n'est en général pas liquéfiée. Le fait est rapidement coagulé avec ou sans rétraction alvéolaire du caillot. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fermentés par la plupart des souches : glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose, lactose, amidon et glycérol, avec forte acidification et dégagement gazeux abondant. Quelques souches n'attaquent pas le glycérol. L'une des souches réduit les nitrates en nitrites en présence de glycérol; toutes les souches réduisent les sulfites en sulfures.

Caractères biochimiques. — La fermentation du bouillon VF glucosé produit une forte acidité volatile : acide acétique et butyrique pour la plupart des souches, mais certaines produisaient un acide supérieur (valérianique ou caproïque). Pas d'acide fixe. Pas d'acétoïne. Traces ou petite quantité de SH_2 . Très grosse quantité de NH_3 (0,5 g par litre). Amines volatiles, éthanol, cétones, aldéhydes, phénol, indole et scatole.

Le caractère biochimique important de ces sept souches est l'existence dans leur équipement enzymatique d'une uréase très active. On sait que l'uréase est relativement rare chez les anaérobies (2) et que, par conséquent, l'existence de cet enzyme chez une espèce ajoute un caractère déterminatif de haute valeur. Dans le cas de cette espèce, cette existence est d'autant plus remarquable que la source d'urée dans ces lacs sans poisson est pauvre. On sait toutefois que certains végétaux forment de l'urée. Il est probable que cet enzyme trouve son substrat dans les plantes des rives de ce lac.

Pouvoir pathogène. — La plupart de ces souches étaient totalement dépourvues de pouvoir pathogène pour le cobaye et la souris et ne produisaient ni toxine ni hémolysine. La souche 1744 A produisait chez le cobaye, après injection intramusculaire de 2,5 cm³ de culture, un abcès qui, après ouverture à la peau et surinfection de cage, tuait l'animal en huit jours. Cette souche ne produisait pas de toxine, mais présentait une hémolysine faiblement active (0,1 cm³ de filtrat de culture de 24 heures hémolysait 0,5 cm³ de la suspension de GR de mouton au 1/20). Une autre souche produisait une nécrose locale et superficielle de la peau et était légèrement hémolytique.

Position dans la systématique et diagnostic différentiel. — La morphologie de ces souches permet de les classer dans le genre *Inflabilis* (3). A l'intérieur de ce genre, leurs cultures gazogènes les situent dans le groupe A, sous-groupe *b* non protéolytique, comprenant six espèces. Il se distingue :

d'*Inflabilis teras* qui a des dimensions plus grandes, ne coagule pas le lait, n'a pas d'uréase;

d'*Inflabilis sanguicole* qui liquéfie la gélatine, n'est pas fétide ni uréasique;

d'*Inflabilis barati* qui est lipidolytique, non indologène, non uréasique;

d'*Inflabilis plagarum* qui est gélatinolytique, non indologène, non uréasique;

d'*Inflabilis setiensis* qui ne coagule pas le fait et n'a pas d'uréase;

d'*Inflabilis carbonei* qui a des colonies rouges, n'est ni indologène, ni uréasique.

Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle dont le caractère le plus marquant est le pouvoir uréasique et pour laquelle nous proposons le nom d'*Inflabilis lacustris* n. sp.

Résumé et conclusion. — Dans les sédiments de cinq lacs de haute montagne inexplorés du Massif du Ruwenzori ont été isolées sept souches d'une nouvelle espèce anaérobie thermorésistante, réductrice, peptolytique, glucidolytique, uréasique, ferment acéto-butyrique, sulfito-réductrice, peu ou pas pathogène, pour laquelle est proposé le nom d'*Inflabilis lacustris*.

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) ELLNER, P. D., *J. Bact.*, 1956, 71, 495.
- (2) HUET, M. et CADORE, F., DE, *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 86, 421.
- (3) PRÉVOT, A.-R., *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit., Masson, 1948, 134.

MÉTHODE AMÉLIORÉE D'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA PECTINOLYSE MICROBIENNE DANS LE SOL (*).

La fonction pectinolytique du sol est assumée par les microorganismes les plus divers (Champignons, Actinomycètes, Bactéries) possédant des types respiratoires variés. Les enzymes responsables sont de trois types : protopectinase, polygalacturonidase, pectine-méthylestérase. Il est donc nécessaire, pour mesurer cette fonction du sol, de dénombrer les germes aérobies et anaérobies, eu égard à ces trois enzymes.

1. Protopectinase.

Certains microorganismes sont capables d'attaquer directement la protopectine. Cette attaque se mesure par le ramollissement de fragments de végétaux tels que carotte, pomme de terre, lin, etc. (1), (2).

(*) Ex *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. 247, 1958, par P. KAISER et A.-R. PRÉVOT (Paris).

Milieu amélioré. — Chaque tube contient un petit cube de carotte immergé dans 6 ml de la solution suivante : 1° pour aérobiose : extrait de terre, 700 ml; eau de rivière, 300 ml pour 1 l de milieu; 2° pour anaérobiose : bouillon de pomme de terre, 500 ml; eau de rivière, 500 ml; extrait de levure (6), 5 g pour 1 l de milieu. Stérilisation : 10 mm à 120° C à l'autoclave. On ensemence 0,5 ml des suspensions-dilutions 10^{-1} à 10^{-7} d'un sol, à raison de cinq tubes par dilution. Les tubes pour les anaérobies sont étirés, scellés sous vide et incubés à 30° C; les aérobies à 26° C. Les résultats sont calculés par les tables de Mc Crady. Il faut noter que ces germes sécrètent souvent une polygalacturonidase.

2. Polygalacturonidase.

La dépolymérisation causée par cette enzyme provoque une forte baisse de viscosité ou la liquéfaction d'un gel de pectine. Pour les aérobies les milieux sur plaques du type Wieringa (3), (4) conviennent le mieux.

Milieu de Wieringa modifié (W 3). — a) Plaque de gélose au chlorure de calcium; pour 1 l : gélose, 15 g; Cl_2Ca , 5 g; extrait de terre, 700 ml; eau de rivière, 300 ml, le tout réparti à raison de 200 ml par tube, stérilisé 20 mm à 120° C; b) Plaque de pectine, pour 1 l : pectine de pomme (7), 18 g; $SO_4(NH_4)_2$, 1 g; PO_4K_2H , 1 g; eau de source, 600 ml; eau distillée, 200 ml; bouillon de pomme de terre, 150 ml; bouillon de carotte, 50 ml; lessive de soude au 1/10°, 6 ml. Préparation : la pectine mise à part dans un récipient est mouillée avec 35 ml d'alcool à 96°. On verse alors le litre de solution chauffé à 80° C d'un seul trait sur la pectine qui se dissout presque instantanément. Répartition à raison de 10 ml par tube; stérilisation en portant l'autoclave momentanément à 120° C. Le pH après stérilisation est de 7. Les tubes de pectine liquide sont ensemencés avec 1 ml de suspension-dilution de terre et coulés sur la couche de gélose solidifiée. La pectine se gélifie 1 h après. Les pectinolytiques y creusent un godet en trois à cinq jours. La moyenne des godets par dilution donne le nombre de germes pectinolytiques.

Pour les germes anaérobies et microaérophiles (type *Clostridium polymyxa*) le milieu suivant a été réalisé (Vr). Pour 1 l : pectine de pomme (7), 13 g; extrait de levure, 5 g; bouillon de pomme de terre, 1.000 ml. Préparation et stérilisation comme plus haut. Répartition : 6 ml par tube de 14 mm. Le milieu ainsi préparé est à pH 5. Au moment de l'emploi, on neutralise à chaud (80°) chaque tube par 0,1 ml de lessive de soude stérile au 1/20°. Les tubes sont ensemencés à 45° C par des dilutions de terre, étirés et scellés sous vide. La pectinolyse se traduit par une liquéfaction du gel. Ce milieu s'aérant très mal ne peut pas être employé pour les aérobies.

3. Pectine-méthylestérase.

La déméthylation d'une pectine se traduit par une production d'acidité. Celle-ci ne peut être mise en évidence qu'indirectement ⁽²⁾, ⁽⁵⁾. Onensemence avec des dilutions de terre les milieux suivants :

1° pour aérobiose, pour 1 l : pectine de pomme ⁽⁸⁾, 7 g; extrait de terre, 800 ml; eau de rivière, 200 ml.

2° pour anaérobiose : pectine de pomme ⁽⁸⁾, 7 g; extrait de levure, 5 g; bouillon de pomme de terre, 1.000 ml. Préparation, répartition, stérilisation, neutralisation comme plus haut. Après 10 à 15 jours d'incubation, on mélange 1 ml de liquide de culture à 7 ml de substrat de Smith ⁽⁵⁾. Les tubes positifs virent du bleu au jaune avant 24 h. Les tables de Mc Crady indiquent le nombre de germes actifs.

Conclusions. — La numération des germes pectinolytiques d'un sol ne pouvait se faire jusqu'ici qu'en aérobiose, et ne donnait par conséquent qu'une mesure incomplète de la fonction pectinolytique considérée comme l'une des grandes fonctions microbiologiques du sol. L'extension des méthodes classiques aux anaérobies grâce à des milieux modifiés permet désormais de dénombrer la totalité des germes pectinolytiques en ajoutant au nombre total d'aérobies, le nombre total d'anaérobies possédant une ou plusieurs des enzymes de la pectinolyse.

Ces méthodes pourront être jointes avantageusement aux autres méthodes de mesure des fonctions microbiologiques d'un sol donné. Elles pourront être de plus utilisées pour deux buts pratiques :

1° La connaissance de la valeur d'une terre ou d'une eau en vue du rouissage naturel;

2° L'évaluation du nombre d'espèces phytopathogènes du genre *Erwinia* dans un sol donné.

(1) LAMBINA, V. A. *Mikrobiologija*, 26, 1957, p. 66.

(2) SAISSAC, R., BRUGIÈRE, J. M. et RAYNAUD, M., *Ann. Inst. Pasteur*, 82, 1952, p. 356.

(3) WIERINGA, K. T., *Congrès Microb. Copenhagen*, 1947.

(4) JONES, G. E., *J. appl. bact.*, 19, 1956, p. 231.

(5) SMITH, W. K., *J. gen. microbiol.*, 18, 1958, p. 33.

(6) Difco.

(7) Unipeptine ruban rouge.

(8) Unipeptine ruban brun.

INSTITUT PASTEUR,
SERVICE DES ANAÉROBIES (Paris).