

50376
1960
24

50376
1960
24

UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DES SCIENCES

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du Diplôme d'Etudes Supérieures de Sciences Naturelles
(Physiologie Végétale)

**Recherche des conditions optimales de développement
d'une Ferrobactériale : le "PERABACTERIUM SPELEI"**



Soutenu à Lille, en Décembre 1960

par Nicole POTELLE

I. PRESENTATION DU "PERABACTERIUM SPELEI"

En Août 1956 et Avril 1957, lors d'expéditions spéléologiques organisées par le Laboratoire souterrain de Moulis, Ariège, un certain nombre de microorganismes furent recueillis par CAUMARTIN, dans des sédiments de grottes, bien que de tels sédiments aient toujours été considérés comme stériles.

Cette découverte fit l'objet d'une note à l'Académie des Sciences, note intitulée : "Recherches sur une bactérie des argiles des cavernes et des sédiments ferrugineux" (t. 245, p. 1758, 1760 du 13 Nov. 1957).

Cette communication révèle que, parmi la flore bactérienne ainsi décelée, figurait une bactérie "d'environ 0,5 μ de largeur et 1 à 1,5 μ de longueur, présentant à chacune de ses extrémités un renflement lui donnant un aspect géminé caractéristique".

"En raison de sa forme en bissac et de son abondance dans les argiles des grottes, la dénomination de Perabacterium (genre) spelei (espèce) lui fut attribuée".

"De nombreux échantillons furent prélevés dans les grottes :

de Moulis (Ariège)

de Sainte-Catherine (Balaguère, Ariège)

de Peyort (Cazavet, Ariège)

d'Aulot (Saint-Girons, Ariège)

de Guillou (Aspet, Haute Garonne)

dans des argiles et des roches calcaires contenant du carbonate de fer et du carbonate de manganèse, ainsi que dans le mond-milch recouvrant les stalactites de Cougnac (Gourdon, Lot)."

"En dehors des cavernes, *Perabacterium spelei* fut retrouvé dans des sédiments appartenant à des époques géologiques très différentes :

craie sénonienne de Picardie
argile plastique sparnacienne de Vaugirard
terre à pipe de la partie supérieure de la basse
terrasse quaternaire d'Amiens
terra rossa de Provence
minerais de fer oolithiques
limonite en place

ou sur des substrats comme le carbonate de fer des laboratoires et la rouille".

"Il semble toujours, sur ces milieux, responsable de la formation de Fe_2O_3 ."

Les études faites ont montré que cette bactérie est "entourée d'une gaine ininterrompue de sesquioxyde de fer hydraté. Dans son milieu naturel, elle est microaérophyle et autotrophe. Elle tire son carbone et son énergie vitale de la décomposition du carbonate de fer, exceptionnellement du carbonate de manganèse et de l'oxydation des oxydes ferreux et manganoux qui en résultent."

Dans cette note, une première étude du métabolisme de cette bactérie et de son comportement en milieux synthétiques, est présentée.

Le problème de la position systématique à attribuer au *Perabacterium spelei* ne peut être résolu de suite, en raison :

de son polymorphisme : existence de figures en cocciés
ou pyriformes, ou triples, ou bigeminées en chaîne
et de sa petite taille.

Les premières recherches conduisirent aux conclusions suivantes :

"Par son métabolisme, cette bactérie s'apparente à la fois aux Chlamydo-bactériales, en particulier au genre Gallionella, dont la forme est voisine, sans pourtant s'organiser en colonies filamenteuses spiralées entourées d'hydrates ferriques issus de la transformation des carbonates de fer, et aux Eubactériales (Azotobactériées), sans cependant être aérobie et saprophyte".

A partir de Décembre 1958, des études, effectuées au microscope électronique, firent apparaître plus nettement la morphologie du Perabacterium spelei et il fut alors possible d'essayer de déterminer avec plus de précision sa position systématique.

Les nouveaux résultats obtenus furent présentés lors d'une réunion de la Société Botanique du Nord de la France, et publiés au Bulletin de cette société (T. XII, n° 1, 1959) sous le titre : "Morphologie et position systématique du Perabacterium spelei".

Perabacterium spelei s'est révélé former un "pseudo-mycelium de $5/10$ à $8/10 \mu$ de largeur, portant, vers ses extrémités, des bourgeons analogues aux conidies levures de certaines mucorales. Ces bourgeonnements levuroïdes ont une largeur de $5/10$ à $8/10 \mu$ et une longueur de $1,5 \mu$; ils sont, en général, plus arrondis à l'extrémité distale ; libérés dans le milieu, ils évoluent en formes ovoïdes ou gémées de $1/2 \mu$ sur $1,5 \mu$ ".

L'hydroxyde ferrique, produit du métabolisme, imprègne la gaine de la bactérie, mais il est essentiellement rejeté dans le milieu extérieur sous forme "d'aiguilles de $1/10 \mu$ de large sur 1μ de long".

"Ces aiguilles sont, le plus souvent, simples mais elles peuvent présenter des formes excentriques. Le pseudo-mycelium, avec ses pseudo-ramifications, a de ce fait l'aspect original d'un cactus".

Ces aiguilles, en suspensions aqueuses, s'hydratent et se dilatent en fuseaux puis se désorganisent.

Le critère physiologique étant déterminant, *Perabacterium spelei*, de par son métabolisme dans les milieux ferreux, se place dans la classe des Sidérobactériales ou Ferrobactériales "bien qu'il ne soit pas aquatique au même titre que les autres."

Il semble apparenté aux Chlamydo-bactériales ; en effet, comme elles
"il peut donner des filaments pseudo-ramifiés
des conidies immobiles
et possède une gaine plus ou moins imprégnée d'hydroxyde de fer"
et s'il ne possède pas d'appareil ciliaire de locomotion, il est néanmoins souvent, sur place, le siège de pulsations rythmiques.

En modifiant quelque peu la définition des Chlamydo-bactériales, à savoir en précisant qu'elles peuvent être :

"aquatiques ou pseudo-aquatiques
possédant une gaine imprégnée d'hydroxyde ferrique
ou d'une matière imprégnée d'hydroxyde ferrique
ou d'une matière organique,
l'hydroxyde ferrique pouvant être excrété
et que certaines formes sont parfois immobiles"

le *Perabacterium spelei* se place dans cet ordre, dans une famille qu'il faudrait créer à côté des Chlamydo-bactériacées.

Au cours de recherches portant sur la "Corrosion biochimique dans un réseau karstique et la genèse du mond-milch", dont les résultats furent publiés aux "Notes bio-spéologiques, XIII, 1958", par CAUMARTIN en collaboration avec Philippe RENAULT, le rôle attribué au *Perabacterium spelei* dans la corrosion des concrétions de cavernes était précisé.

Une étude plus approfondie du métabolisme de cette bactérie, et de son évolution dans les argiles, fut reprise dans le cadre d'une autre publication de CAUMARTIN, présentant "quelques aspects nouveaux de la microflore des cavernes" et publié dans les Annales de Spéléologie, Tome XIV, Fasc. 1-2-1959.

II. BUT A ATTEINDRE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES DE TRAVAIL

Le travail présenté ici a eu pour but d'obtenir un milieu répondant aux exigences du *Perobacterium spelei*, pour lequel nous recherchions un développement optimum. Nous avons donc été amenée à étudier l'action de différentes substances minérales et organiques sur le développement de cette bactérie et cela en fonction de la concentration du milieu en ces substances.

Les cultures ont été faites en milieux liquides, en tubes à essais.

Le *Perobacterium spelei* était obtenu à partir d'une vieille réserve de carbonate de fer du laboratoire.

METHODE DE TRAVAIL POUR CHAQUE SERIE D'ESSAIS SUCCESSIFS

- Préparation, à une concentration déterminée, de solutions de diverses substances minérales et organiques devant entrer dans la composition du substrat de culture.

- A l'aide de pipettes de 1 cc, 2 cc, 5 cc, 10 cc, ou de burettes graduées, ces solutions sont réparties en tubes à essais en volumes tels qu'y soient réalisés des milieux de culture aux concentrations connues en leurs divers constituants.

- L'alcalinité des milieux de culture a été obtenue en ajoutant dans chacun des tubes préparés, une pincée de CO_3Ca . Nous réalisons ainsi un apport de carbonate nécessaire au métabolisme du *Perabacterium*.

- Obtention du *Perabacterium* pour ensemencement.

Il s'agit d'extraire du carbonate de fer les bactéries permettant un ensemencement ultérieur. En vue d'obtenir une suspension du *Perabacterium* dans un liquide dépourvu de particules minérales, nous avons utilisé la technique dite "des mousses". Cette méthode est due à CAUMARTIN, qui l'a utilisée, lors de ses recherches, pour séparer les microorganismes des sédiments qui les renferment :

De l'eau distillée est ajoutée, dans un petit Becher, à une faible quantité de carbonate de fer. On introduit quelques parcelles d'un savon de Marseille stérilisé, sous forme de poudre ou de paillettes - l'utilisation des détersifs étant déconseillée.

L'ensemble est agité grâce à une palette rotative mue par un moteur. Une mousse de savon se forme en surface et il est apparu que les bactéries remontaient en abondance sur les parois des bulles. Aussi prélevons-nous cette mousse, pratiquement incolore, à l'aide d'une pipette. Elle est mise en suspension aqueuse. Nous obtenons ainsi un milieu extrêmement riche en *Perabacterium spelei*.

- Ensemencement.

Pour essayer d'obtenir une homogénéité d'ensemencement au cours de toutes nos cultures, nous avons toujours introduit 5 gouttes de suspensions de *Perabacterium*, préparées identiquement.

Après ensemencement, les tubes sont bouchés.

- Stérilisation.

Le *Perabacterium spelei* "offre une très grande résistance aux procédés habituels de stérilisation (autoclave à 120° , alcool, éther, phénol, acides organiques, acides minéraux à 10 %)".

Aussi ce sont des tubes, ensemencés et fermés, que nous portons à l'autoclave où ils restent soumis, pendant 20 à 25 minutes, à une température de 100 à 120° .

Cette pratique écarte tous risques de pollutions pouvant survenir lors de l'ensemencement, s'il est réalisé après la stérilisation du milieu.

Le *Perabacterium spelei* semble indifférent à ce traitement. Il conserve son aspect et ses caractéristiques.

Un tel procédé s'est révélé ne nuire en rien au développement ultérieur des colonies.

- Etuve.

L'étuve du laboratoire a été réglée de façon à assurer une température stabilisée à 23°C, température favorable à l'incubation des microorganismes.

Les tubes y sont maintenus pendant une durée fixée à 10 jours, au bout desquels les bactéries, en plein développement, sont étudiées.

MOYENS D'ETUDE

Nous avons utilisé un microscope avec oculaire n° 8.

L'observation, avec emploi d'un objectif n° 6, conduisait à un grossissement de 600.

L'utilisation d'un objectif à immersion permettait d'obtenir un grossissement égal à 1000.

Le *Perabacterium* apparaît, à l'examen, dans ces conditions, avec un aspect ponctiforme, sphérique ou ovoïde, rarement bigéminé.

Il est le siège de pulsations rythmiques bien observables.

Pour comparer les développements du microorganisme, obtenus lors des différents essais, nous avons utilisé la méthode des comptages à l'aide d'une cellule de Thoma. Une telle cellule est constituée par une lame de verre présentant, dans sa partie centrale,

un évidement cubique avec un quadrillage sur le fond.

Chaque cellule du quadrillage a

une base carrée de $1/400 \text{ mm}^2$ de surface

et $1/10 \text{ mm}$ de profondeur.

Le volume de chacune de ces petites loges est donc de $1/4000 \text{ mm}^3$.

Une goutte du prélèvement à observer est placée sur cette cellule. Elle est recouverte d'une lamelle optiquement plane, s'appliquant exactement contre la lame, de façon à assurer une régularité d'épaisseur du liquide.

Nous déterminons le nombre de bactéries apparaissant dans chaque carré de la cellule.

Plusieurs prélèvements successifs sont effectués et l'opération de comptage répétée plusieurs fois. Si les prélèvements sont homogènes, les chiffres obtenus sont voisins. Nous nous sommes toujours efforcés d'obtenir cette homogénéité.

La moyenne des résultats est établie.

Cette valeur, qui représente un nombre moyen de bactéries par logette, figure la richesse de la culture en organismes.

Elle servira de grandeur de comparaison pour l'étude du développement du *Perabacterium spelei* en fonction des milieux qui lui sont offerts.

PRECISION DES RESULTATS

La détermination du nombre de bactéries représentatif du développement du *Perabacterium* requiert diverses opérations expérimentales :

1. Pour la constitution des solutions titrées, nous avons effectué des pesées de substances minérales ou organiques, substances qui ont été dissoutes dans des volumes d'eau bien déterminés.

Pour préparer des solutions de faibles concentrations : 1/1000 ou 1/10000 par exemple, nous avons procédé par dilutions, faites toujours dans les mêmes conditions, à partir d'une solution au 1/100.

Cette pratique de dilutions limitait l'erreur qui aurait risqué de se produire lors de pesées de très petites quantités de substances.

2. Des prélèvements de ces solutions ont été faits, en volumes tels que soit constitué un milieu de culture de composition préalablement établie,

Les erreurs produites risquent d'être dues :

- aux appareils de pesées et de mesures volumétriques. Pour les réduire, nous avons utilisé balance de précision, et éprouvettes, burettes et pipettes bien calibrées, graduées et de volume de l'ordre de grandeur de celui que nous voulions mesurer.
- aux manipulations elles-mêmes ; aussi leur avons-nous apporté le plus grand soin.

Néanmoins, ces pesées et mesures de volumes introduisent une marge d'incertitude quant à l'obtention du milieu que nous cherchons à préparer.

3. Enfin, tous les résultats chiffrés, reliant le milieu de culture à sa plus ou moins grande richesse en Perabacterium, sont obtenus par comptage du nombre de bactéries par unité de la cellule de Thoma. Cette opération peut entraîner des erreurs.

Les valeurs obtenues sont donc approximatives ; aussi avons-nous effectué plusieurs prélèvements et plusieurs comptages successifs et c'est le nombre moyen de bactéries par unité de Thoma qui a été retenu comme valeur la plus probable et utilisé pour le tracé des courbes.

Afin de rendre possible une vérification de certains résultats, quelques tubes aux concentrations identiques en une même substance ont été reproduits deux fois.

III. PLAN DES RECHERCHES EXPOSEES ICI

Nous avons tout d'abord effectué une culture d'essai du *Perabacterium spelei* sur un milieu témoin où figuraient, entre autres éléments, ceux d'une solution saline standard de Winogradsky.

Puis, au cours de chaque série de cultures, l'un des éléments de la solution de Winogradsky était introduit dans les tubes, à des concentrations différentes, en fonction desquelles a pu être tracée la courbe de développement des bactéries.

Après avoir étudié les équilibres ioniques et recherché les valeurs des rapports $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$ et $\frac{Cl^{-}}{SO_4^{--}}$ les plus favorables à la prolifération des *Perabacterium*, nous avons établi un bilan minéral permettant de constituer un milieu de culture amélioré. Il est constitué de telle façon que la concentration de chaque substance soit celle pour laquelle les bactéries se sont développées en plus grand nombre lors des essais précédents et les équilibres ioniques favorables y sont respectés.

Nous avons ensuite recherché à quel taux il convenait d'introduire les substances organiques : peptone, bouillon de pommes de terre.

Enfin, nous avons fait varier le temps de séjour des tubes de culture à l'étuve, en vue de déterminer la durée requise pour l'obtention du plus grand nombre d'organismes.

En définitive, ces travaux nous ont conduite à établir un milieu de culture permettant un développement optimum du *Perabacterium spelei*.

IV. PREMIER ESSAI DE CULTURE - CONSTITUTION D'UN TUBE TEMOIN

MILIEUX DE CULTURE UTILISES

A. L'apport des éléments minéraux a été assuré par :

1. la solution saline standard de Winogradsky, établie pour la culture de bactéries. Elle fournit du potassium sous forme de phosphate bipotassique, du sodium sous forme de chlorure, le magnésium, le fer et le manganèse figurant sous forme de sulfates, dans les proportions suivantes :

PO_4HK_2	5	g
SO_4Mg	2,5	g
ClNa	2,5	g
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	0,05	g
SO_4Mn	0,05	g

pour un volume d'eau de 1000 cc

2. Mais ici le fer est présent sous forme ferrique. Le *Perobacterium spelei* appartenant aux Ferrobactériales, il est nécessaire de lui apporter du fer à oxyder.

Cet apport est donc fait sous forme de sulfate ferreux qui remplace le sulfate ferrique dans une solution que nous appellerons solution saline standard de Winogradsky modifiée ; sa constitution est la suivante :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mg	2,5 g
ClNa	2,5 g
SO_4Fe	0,05 g
SO_4Mn	0,05 g

pour un volume d'eau de 1000 cc.

B. Les éléments organiques sont fournis par :

1. Une solution de peptone à 1 %

2. Un bouillon de pommes de terre.

Les pommes de terre, bien lavées, sont pesées, coupées en morceaux et portées à ébullition pendant environ deux heures. Le bouillon est filtré à chaud et assez vite, de façon à éviter les oxydations qui se produisent rapidement au contact de l'air.

Pour chercher à obtenir la constance de concentration de ce bouillon au cours des séries de cultures successives, le même rapport entre poids de pommes de terre et volume définitif du filtrat a été maintenu : nous avons porté 500 g de pommes de terre à l'ébullition et le filtrat a été amené à 500 cc.

Ce bouillon de pommes de terre fournit probablement des substances oligodynamiques.

Le milieu de culture d'essai a été constitué comme suit :

1 cc solution saline standard de Winogradsky

1 cc solution saline standard de Winogradsky, modifiée

3 cc solution de peptone à 1 %

3 cc bouillon de pommes de terre

auxquels ont été ajoutés 22 cc d'eau, pour porter le volume total à 30 cc.

La constance de ce volume du milieu de culture a été respectée au cours de toutes les expériences effectuées. Ainsi, lorsqu'une substance figure dans le milieu en

quantité fixe, sa concentration y demeure inchangée, ce qui facilite la comparaison de résultats obtenus lors de différentes séries de recherches. Nous effectuons l'apport de CO_2Ca .

Pour ce premier essai, 5 tubes ont été préparés, ensemencés, stérilisés et mis à l'étuve pendant 10 jours, au bout desquels nous avons effectué les comptages des organismes, en pratiquant :

- un premier prélèvement en surface
- puis un prélèvement en profondeur, à 2 cm environ au-dessus du fond du tube.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

NOMBRE DE BACTERIES EN SURFACE (par carré)	MOYENNE	NOMBRE DE BACTERIES EN PROFONDEUR (par carré)	MOYENNE
2-0-4-3-2-3-5-3-8-6	3,6	0-2-4-3-2-3-4-4	2,7
0-4-7-5-2-6-5-4	4	5-3-0-0-4-2-3-5-2-0	2,4
0-6-4-3-5-4-2-5-0	3,2	2-3-0-4-5-4-3	2,9
3-0-2-3-5-4-3-3-5-4-6	3,5	0-2-3-5-4-0-3-2-3-1-0	2,1
3-0-2-4-5-4-8-3-6-3-4-4	3,8	4-2-4-3-0-5-2-3-4-0-1-2	2,5
Moyenne	3,6	Moyenne	2,5



Un tube de composition semblable à celle de cette première culture a été reproduit au cours de chaque série de recherches. Il constituait un tube témoin où le développement du *Perabacterium* devait s'avérer toujours sensiblement le même.

V. ACTION DU PHOSPHATE DE POTASSIUM
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Nous recherchons quelle est l'influence de la concentration du milieu de culture en phosphate de potassium, sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

- Sont utilisées pour la préparation des tubes de culture :

une solution saline standard de Winogradsky, dépourvue de PO_4HK_2 .
Pour cette série d'essais, PO_4HK_2 est apporté par des solutions de cette substance introduites dans les tubes en volumes déterminés pour que des concentrations régulièrement croissantes soient obtenues.

Cette solution est donc composée de :

SO_4Mg	2,5 g
ClNa	2,5 g
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	0,05 g
SO_4Mn	0,05 g

pour 1000 cc d'eau épurée.

• une solution de Winogradsky modifiée, sans PO_4HK_2 et constituée
comme suit :

SO_4Mg 2,5 g

ClNa 2,5 g

SO_4Fe 0,05 g

SO_4Mn 0,05 g

pour 1000 cc d'eau épurée.

• des solutions de PO_4HK_2 à 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10.

• un bouillon de pommes de terre.

• une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

- Dans chacun des tubes sont portés :

1 cc de solution de Winogradsky sans PO_4HK_2

1 cc de solution de Winogradsky modifiée, sans PO_4HK_2

3 cc de solution de peptone

3 cc de bouillon de pommes de terre

constituant 1 volume de 8 cc.

auxquels sont ajoutées, en volumes convenables, solutions de PO_4HK_2 et eau, pour que la concentration désirée en PO_4HK_2 soit obtenue, le volume total du milieu de culture étant porté à 30 cc.

Nous ajoutons ensuite le CO_3Ca pour alcaliniser le milieu.

	PO ₄ HK ₂	EAU	CONCENTRATION EN PO ₄ HK ₂
tube 0		22 cc	nulle
tube 1'	$\frac{1}{2}$ cc	} solution à $\frac{1}{10.000}$	$\frac{1,6}{1.000.000}$
tube 2'	1 cc		$\frac{3,3}{1.000.000}$
tube 3'	2 cc		$\frac{6,6}{1.000.000}$
tube 4'	5 cc		$\frac{1,65}{100.000}$
tube 5'	10 cc		$\frac{3,3}{100.000}$
tube 6'	15 cc		$\frac{4,95}{100.000}$
Vérification du tube 5':tube 7'	1 cc		21 cc
tube 8'	3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100.000} \neq \frac{1}{10.000}$
tube 1	1 cc	} solution à $\frac{1}{100}$	$\frac{3}{10.000}$
tube 2	5 cc		$\frac{1,65}{1.000}$
tube 3	10 cc		$\frac{3,3}{1.000}$
tube 4	15 cc		$\frac{4,95}{1.000}$
tube 5	20 cc		$\frac{6,6}{1.000}$
Vérification du tube 3:tube 6	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 7	5 cc	} solution à $\frac{1}{10}$	$\frac{1,6}{100}$
tube 8	10 cc		$\frac{3,3}{100}$
tube 9	15 cc		$\frac{4,98}{100}$
tube 10	20 cc		$\frac{6,6}{100}$



Pour le tube X témoin

la concentration en PO₄HK₂ est de

$$\frac{3,3}{10.000}$$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

COURBE

Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma, en fonction de la concentration du milieu de culture en phosphate bipotassique.

Les concentrations, à porter en abscisses, s'échelonnant entre 1/1.000.000 et 1/10, il s'est avéré nécessaire d'utiliser sur l'axe des abscisses une graduation logarithmique.

En ordonnées, figure un nombre de bactéries, qui requiert une graduation millimétrique.

Aussi avons-nous utilisé, pour le tracé des courbes, un papier semi-logarithmique.

Des prélèvements ayant été effectués dans les milieux de culture, en surface et en profondeur, nous avons pu représenter les variations du développement du *Perabacterium* en fonction des concentrations du milieu en la substance étudiée:

- pour un prélèvement en surface d'une part
- pour un prélèvement en profondeur d'autre part.

Deux courbes illustrent donc l'action d'une substance donnée sur le développement du *Perabacterium* :

Les courbes de développement en surface sont anotées S sur les graphiques et les courbes de développement en profondeur sont anotées P.



Aktion du PO_4HK_2

S : Courbe de développement en surface
P : Courbe de développement en profondeur

Nombre de bactéries

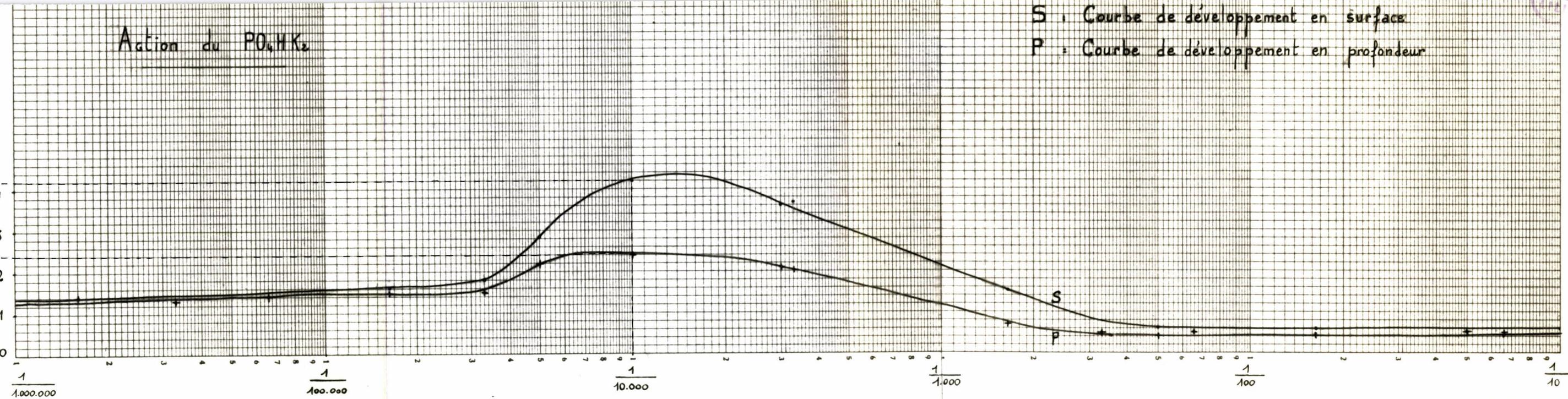
4,2

2,4

0

$\frac{1}{1.000.000}$ $\frac{1}{100.000}$ $\frac{1}{10.000}$ $\frac{1}{1.000}$ $\frac{1}{100}$ $\frac{1}{10}$

Concentration en PO_4HK_2



INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

Nous voyons que la courbe représentative du développement des organismes en surface se situe un peu au-dessus de celle obtenue pour le développement des bactéries d'après un prélèvement fait en profondeur dans le tube de culture.

Ceci nous permet de conclure que :

- l'aération du milieu favorise la croissance du Perabacterium
- mais que cependant cet organisme se développe en profondeur dans le tube (c'est un microaérophile).

L'écart entre les nombres moyens de bactéries par unité de la cellule de Thoma, obtenus lors des deux prélèvements, est souvent faible. Parfois même les deux développements sont identiques.

La plus ou moins grande richesse du milieu en organismes est d'ailleurs révélée par l'observation des tubes. En effet, un trouble apparaît dans le tube lorsque les colonies sont bien installées ; il est visible, vers le 5^e jour d'étuve et s'accroît jusqu'au 10^e jour environ. Ce trouble présente à peu près la même intensité en surface et en profondeur ou est à peine plus dense en surface.

Le Perabacterium spelei n'est donc pas une bactérie strictement aérobie. Si l'aération du milieu est favorable à sa croissance, elle se développe néanmoins en milieu faiblement aéré.

Son comportement est donc celui d'un organisme microaérophile. L'oxygène qu'il utilise est celui de l'atmosphère surmontant le liquide de culture dans le tube, mais aussi l'oxygène dissous dans le milieu lui-même. L'eau employée pour fabriquer les milieux de culture possède de l'oxygène dissous : en effet, ce n'est pas une eau distillée, mais une eau épurée à l'aide d'un appareil à colonne. Cet appareil assure la déminéralisation et desionisation de l'eau. Il en porte la résistivité à 2.000.000 Ω , alors que des mesures ont montré que celle-ci n'est que de :

2.000 Ω pour l'eau de ville fournie à l'utilisation domestique
130.000 Ω pour une eau distillée
320.000 Ω pour une eau bidistillée.

Cet oxygène sert à oxyder le FeO, provenant de la décomposition du carbonate de fer, en Fe₂O₃. Cette oxydation se fait avec libération d'énergie utilisée par la bactérie :

- en faible partie pour la décomposition de CO₃Fe
- mais essentiellement pour la synthèse des composés du carbone : cette énergie permet la réduction de CO₂.

Le développement du Perabacterium spelei, au cours de cette série de cultures, est moins important que dans le tube témoin, sauf près du maximum où il lui est approximativement égal.

L'action inhibitrice de la croissance, apparaissant ici, est probablement due :

- au phosphate de potassium lui-même
- ou à un déséquilibre ionique existant dans les milieux de culture réalisés ici.

Pour des concentrations en PO₄HK₂ inférieures à 5/100.000 et supérieures à 5/10.000, le Perabacterium se développe mal.

Nous notons sa croissance optimum pour une concentration en PO₄HK₂ voisine de 1/10.000.

C'est cette concentration qui sera retenue pour la constitution ultérieure d'un milieu amélioré.

VI. ACTION DU SULFATE DE MAGNESIUM
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Recherche de l'influence de la concentration du milieu de culture en sulfate de magnésium, sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisées pour la préparation des tubes de culture :

- une solution saline standard de Winogradsky dépourvue de SO_4Mg , dont la composition est la suivante :

PO_4HK_2	5 g
$ClNa$	2,5 g
$(SO_4)_3Fe_2$	0,05 g
SO_4Mn	0,05 g

pour 1.000 cc d'eau.

- une solution de Winogradsky modifiée, sans SO_4Mg , constituée comme suit :

PO_4HK_2	5 g
$ClNa$	2,5 g
SO_4Fe	0,05 g
SO_4Mn	0,05 g

pour 1.000 cc d'eau.

- des solutions de SO_4Mg à 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10.
- un bouillon de pommes de terre.
- une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

1 cc de solution de Winogradsky dépourvue de SO_4Mg

1 cc de solution de Winogradsky modifiée, sans SO_4Mg

3 cc de solution de peptone

3 cc de bouillon de pommes de terre

auxquels sont ajoutées solutions de SO_4Mg et eau, pour réaliser dans les divers tubes des concentrations en SO_4Mg régulièrement croissantes, comme l'indique le tableau suivant.

Nous effectuons également l'apport de CO_3Ca .

	SO ₄ Mg	EAU	CONCENTRATION EN SO ₄ Mg
tube 0		22 cc	nullie
tube 1'	$\frac{1}{2}$ cc	21,5 cc	$\frac{1,6}{1.000.000}$
tube 2'	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000.000}$
tube 3'	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000.000}$
tube 4'	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{100.000}$
tube 5'	10 cc	20 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 6'	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{100.000}$
Vérification du tube 5'	tube 7'	21 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 8'	3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100.000} \neq \frac{1}{10.000}$
tube 1	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{10.000}$
tube 2	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{1.000}$
tube 3	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 4	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{1.000}$
tube 5	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{1.000}$
Vérification du tube 3	tube 6	21 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 7	5 cc	17 cc	$\frac{1,66}{100}$
tube 8	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100}$
tube 9	15 cc	7 cc	$\frac{4,98}{100}$
tube 10	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{100}$

Pour le tube témoin X la concentration en SO₄ Mg est de

$$\frac{1,66}{10.000}$$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN SO ₄ Mg	RAPPORT IONS Cl ⁻ IONS SO ₄	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE SURFACE	MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE SURFACE	MOYENNE
tube 0			5-1-2-0-3-1-0-2-1-1-4- 3-1-4-2-0-1-2-1-0-3-	1,8 1,7	3-0-2-1-4-0-2-1-3-0- 4-0-2-1-3-2-0-1-2-2-	1,6 1,7
tube 1 ¹	$\frac{1,6}{1.000,000}$	48	3-1-2-1-2-1-5-4-2-0-1-	2	3-2-3-0-2-3-1-1-1-	1,8
tube 2 ¹	$\frac{3,3}{1.000,000}$	41	3-1-2-1-2-2-2-1-3-	1,9	3-2-1-0-1-2-1-0-1-5-4-	1,8
tube 3 ¹	$\frac{6,6}{1.000,000}$	29	3-2-1-2-1-2-0-4- 2-1-0-3-2-1-3-	1,9 1,7	3-2-0-2-1-1-1-2-4-	1,7
tube 4 ¹	$\frac{1,65}{100,000}$	16	4-3-1-2-3-2-4-2-5-0- 4-1-2-0-1-2-4-3-5-	2,6 2,5	2-3-1-0-1-2-3-4-2-	2
*tube 5 ¹	$\frac{3,3}{100,000}$	9,3	3-2-2-2-3-2-4-2-	2,5	3-1-2-2-1-2-0-4-	1,9
tube 6 ¹	$\frac{4,95}{100,000}$	6,5	3-2-1-3-4-2-3-4-2-3-	2,7	2-1-0-2-3-4-0-2-	2
*tube 7 ¹	$\frac{3,3}{100,000}$	9,3	3-2-2-2-1-0-2-4-8-2-	2,6	2-4-2-0-2-2-3-2-1-	2
tube 8 ¹	$\frac{9,9}{100,000} \# \frac{1}{10,000}$	3,2	5-2-6-3-4-0-1-2- 4-0-2-5-1-2-3-8-	3 3,1	2-2-0-1-3-4-2-3- 2-4-0-3-4-2-1-2-5-	2,1 2,2
tube 1	$\frac{3,3}{10,000}$	1,008	5-6-6-6-9-5-8-8-6-8-8- 7-9-8-5-5-5-6-7-6-7-8-5-12-	7 7,4	7-8-9-6-9-4-8- 7-8-9-6-5-6-4- 8-7-5-6-9-7-6-8-10-	7,3 7,4 7,3
tube 2	$\frac{1,65}{1,000}$	0,204	10-8-10-8-7-8-9-7-14-12- 11-10-6-10-11-8-9-12-9-	9 9,5	10-8-8-10-9-10-7- 9-8- 8-10-8-9-12-9- 9- 7-14-10-9-7-9-11-5-9-	8,8 9,3 8,9
*tube 3	$\frac{3,3}{1,000}$	0,102	7-8-11-9-8-9-11-5-7-11-10-9- 10-10-7-10-9-8-9-7-8-	8,9 8,7	8-7-7-8-8-9-7-6-8- 7-8-9-8-9-7-7-8-9-	7,6 8
tube 4	$\frac{4,95}{1,000}$	0,068	10-4-3-5-7-7-5-6-7- 6-7-8-5-7-8-8-6-7-	6 7,8	6-9-6-8-5-6-6-8-8-7- 8-7-7-6-9-6-10-8-7-8-	6,9 7,6
tube 5	$\frac{6,6}{1,000}$	0,051	9-8-6-4-5-7-6-5-7-6- 6-7-5-4-6-5-10-6-6-7-	6,3 6,2	7-5-5-4-7-9-7- 6-6-6-6-4-10-5-5-	6,3 6
*tube 6	$\frac{3,3}{1,000}$	0,102	10-8-7-9-8-9-6-8-7- 5-6-8-6-7-9-11-13-7-10	8 8,2	6-5-9-6-5-7-9-8-11-8-	7,4
tube 7	$\frac{1,66}{100}$	0,02	6-6-5-5-6-3-5-7- 6-7-8-6-5-5-3-6-	5,3 5,7	6-8-5-6-9-7-6-4- 5-8-5-6-7-10-6-7-5-	5,3 5,5
tube 8	$\frac{3,3}{100}$	0,010	6-3-6-3-4-9-7-6-9- 6-5-3-7-9-6-9-4-	5,7 6	5-7-3-5-4-6-7- 5-4-5-6-8-3-6-9-	5,3 5,7
tube 9	$\frac{4,98}{100}$	0,006	6-7-5-4-7-4-5-4-7-3- 7-5-4-4-3-8-3-5-7-	5,2 5,1	7-6-4-8-3-5-6-3- 5-8-6-5-3-5-4-5-	5,3 5,1
tube 10	$\frac{6,6}{100}$	0,005	5-4-4-5-4-3-4-3-5-12- 4-5-8-3-7-2-4-5-	4,9 4,5	7-3-5-6-3-4-5-6-3- 4-6-5-3-4-5-6-	4,9 4,7
tube X	$\frac{1,66}{10,000}$		4-3-4-3-4-2-3-6-2-6- 8-2-3-5-4-5-3-	3,7 4,2	2-3-1-3-2-2-2-1- 3-4-2-3-2-2-1-0-3-	2 2,2

COURBE

Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma, en fonction de la concentration du milieu de culture en sulfate de magnésium.

Action du SO_4Mg

S : Courbe de développement en surface
P : Courbe de développement en profondeur

Nombre de bactéries

9,3

9

8

7

6

5

4

3

2

1

0

$\frac{1}{1.000.000}$

$\frac{1}{100.000}$

$\frac{1}{10.000}$

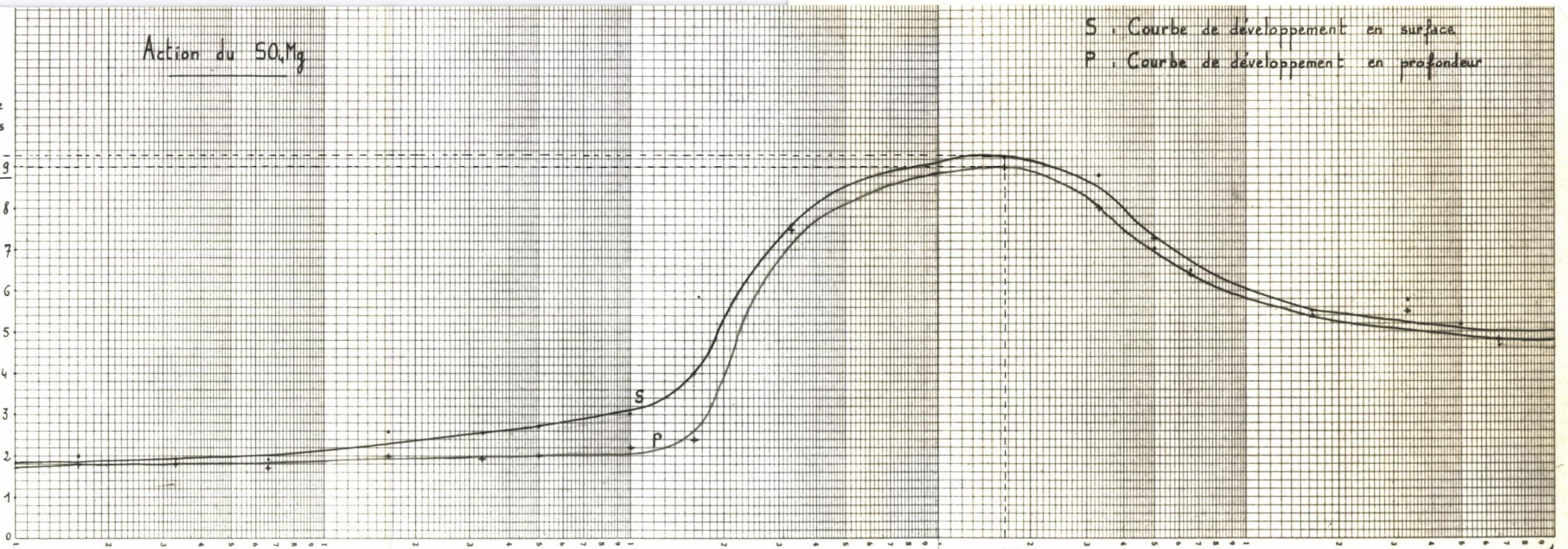
$\frac{1}{1000}$

$\frac{1,65}{1000}$

$\frac{1}{100}$

$\frac{1}{10}$

Concentration en SO_4Mg



INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

La courbe traduisant le développement du *Parabacterium spelei* dans la partie supérieure du tube se place, comme dans la série précédente, légèrement au-dessus de la courbe traduisant le développement en profondeur, ce qui confirme la microaérophilie.

Les milieux préparés dans les différents tubes ont permis aux bactéries de se développer en nombre beaucoup plus important que lors des essais antérieurs : en effet, le nombre moyen d'organismes par unité de la cellule de Thoma varie de 2 à 9.

Si la concentration en SO_4Mg est inférieure à $1,5/10.000$, la bactérie se développe peu : on obtient moins de 4 organismes par unité.

Si elle est supérieure à $1,5/100$, le développement se stabilise autour de 6 bactéries par unité.

La zone de croissance la plus favorable se situe entre ces deux valeurs, le développement optimum - environ 9 bactéries par unité - étant obtenu pour une concentration en SO_4Mg égale à $1,6/1.000$.

VII. ACTION DU CHLORURE DE SODIUM
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Recherche de l'influence de la concentration du milieu de culture en chlorure de sodium, sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la préparation des tubes de culture :

- une solution saline standard de Winogradsky, dépourvue de ClNa, dont la composition est la suivante :

$PO_4 HK_2$	5 g
$SO_4 Mg$	2,5 g
$(SO_4)_3 Fe_2$	0,05 g
$SO_4 Mn$	0,05 g

pour 1.000 cc d'eau épurée.

- une solution de Winogradsky modifiée, sans ClNa, constituée comme suit :

$PO_4 HK_2$	5 g
$SO_4 Mg$	2,5 g
$SO_4 Fe$	0,05 g
$SO_4 Mn$	0,05 g

pour 1.000 cc d'eau.

- des solutions de ClNa à 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10.
- un bouillon de pommes de terre.
- une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

- 1 cc de solution de Winogradsky, dépourvue de ClNa
- 1 cc de solution de Winogradsky modifiée, dépourvue de ClNa
- 3 cc de solution de peptone
- 3 cc de bouillon de pommes de terre

constituant 8 cc auxquels sont ajoutés le CO_2 Ca et des solutions de ClNa et eau, pour réaliser, dans les différents tubes, des concentrations en ClNa régulièrement croissantes, comme l'indique le tableau suivant.

	Cl Na	EAU	CONCENTRATION EN Cl Na
tube 0		22 cc	nullie
tube 1 ¹	$\frac{1}{2}$ cc	21,5 cc	$\frac{1,6}{1.000.000}$
tube 2 ¹	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000.000}$
tube 3 ¹	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000.000}$
tube 4 ¹	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{100.000}$
tube 5 ¹	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 6 ¹	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{100.000}$
Vérification du tube 5 ¹	tube 7 ¹ 1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
	tube 8 ¹ 3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100.000} \neq \frac{1}{10.000}$
	tube 1	21 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
	tube 2	17 cc	$\frac{1,65}{1.000}$
	tube 3	12 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
	tube 4	7 cc	$\frac{4,95}{1.000}$
	tube 5	2 cc	$\frac{6,6}{1.000}$
Vérification du tube 3	tube 6	21 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
	tube 7	17 cc	$\frac{1,66}{100}$
	tube 8	12 cc	$\frac{3,3}{100}$
	tube 9	7 cc	$\frac{4,98}{100}$
	tube 10	2 cc	$\frac{6,6}{100}$



Pour le tube témoin X la concentration en Cl Na est de

$$\frac{1,66}{10.000}$$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultat des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN C11a	RAPPORT IONS SO ₄	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 0	null	0	3-2-4-2-3-4-6-2-4-3- 2-1-2-3-3-4-6-	3,2 3	2-1-3-2-3-2-2-2-1-	2
tube 1	$\frac{1,6}{1.000,000}$	0,019	3-4-2-1-3-2-6-	3	1-3-2-2-2-3-1-	2
tube 2	$\frac{3,3}{1.000,000}$	0,038	3-2-2-3-3-4-4-5-4-	3,3	1-3-2-1-2-3-1-4-	2,1
tube 3	$\frac{6,6}{1.000,000}$	0,076	1-2-3-3-2-3-4-4-5-4-	3,1	3-2-1-2-4-2-	2,3
tube 4	$\frac{1,65}{100,000}$	0,19	3-2-1-9-2-0-5-4-	3,2	5-4-1-2-0-1-2-2-1-4- 3-4-3-2-2-2-1-	2,2 2,4
*tube 5	$\frac{3,3}{100,000}$	0,38	3-4-1-3-2-4-3-2-6-	3,1	3-2-3-1-2-1-3-	2,1
tube 6	$\frac{4,95}{100,000} \neq \frac{0,5}{10,000}$	0,57	6-7-1-3-5-5-6-5-9-7-8- 0-3-2-5-6-11-8-4-5-2-	5,6 5,4	3-2-0-0-3-1-4-	3
*tube 7	$\frac{3,3}{100,000}$	0,38	3-4-2-5-4-2-3-4-2-	3,2	3-2-2-1-5-2-3-2-	2,4
tube 8	$\frac{9,9}{100,000} \neq \frac{1}{10,000}$	1,17	4-3-2-4-3-8-3-	3,8	2-3-4-0-5-2-1-1-	2,2
tube 1	$\frac{3,3}{10,000}$	3,9	4-3-1-1-2-5-1-3-2-1- 4-3-1-3-1-1-2-3-	2,3 2,2	2-1-0-1-1-2-1-1- 3-1-1-1-2-0-1-2-	1,1 1,3
tube 2	$\frac{1,65}{1,000}$	19,5	2-1-2-1-2-3-3-2- 1-2-1-2-2-3-2-3-4-	2 2,2	1-2-2-3-0-1-0- 0-3-2-1-2-2-0-	1,3 1,4
*tube 3	$\frac{3,3}{1,000}$	39	2-2-1-2-3-1-1-1-2- 1-2-3-1-0-2-	1,6 1,5	3-1-0-1-2-1-1- 1-2-2-1-1-1-	1,2 1,3
tube 4	$\frac{4,95}{1,000}$	58,5	2-1-1-0-3-2-2-1- 1-1-2-2-1-0-5-	1,5 1,4	1-1-2-0-1-2-1-2-0-	1,1
tube 5	$\frac{6,6}{1,000}$	78	2-1-3-0-0-1-2-3- 1-2-0-1-3-1-	1,5 1,3	1-2-1-1-0-1-1-1-3-0-0-	1
*tube 6	$\frac{3,3}{1,000}$	39	2-0-3-1-2-1-1-1-2- 2-1-0-1-0-0-1-3-	1,4	2-1-0-0-1-2-1-3-	1,2
tube 7	$\frac{1,66}{100}$	195	2-1-0-1-0-0-1-2- 1-0-1-0-1-2-	1 0,9	1-0-0-1-1-1-0-1-	0,6
tube 8	$\frac{3,3}{100}$	390	0-0-1-0-1-0-0-2-1- 2-1-1-0-0-0-1-0-0-	0,6 0,5	0-1-0-0-1-1- 0-1-0-0-1-	0,5 0,4
tube 9	$\frac{4,98}{100}$	585	0-0-1-0-0-0-0-1- 1-0-0-0-0-	0,3 0,2	1-0-0-0-0-0-1-0-	0,2
tube 10	$\frac{6,6}{100}$	780	1-0-0-2-0-0-0-1-0- 0-0-1-0-0-0-0-1-0-0-	0,4 0,2	0-1-0-0-0-0-1-0-0-0-0-	0,1
tube X	$\frac{1,66}{10,000}$		4-4-2-3-6-3-3- 6-5-3-4-3-3-2-	3,6 3,7	2-1-2-3-1-2-3-	2

COURBE

Représentation du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma
en fonction de la concentration du milieu de culture en chlorure de sodium.



Action du CINa

Nombre de bactéries

5,5

5

4

3

2

1

0

$\frac{1}{1.000.000}$

$\frac{1}{100.000}$

$\frac{5}{100.000}$

$\frac{1}{10.000}$

$\frac{1}{1000}$

$\frac{1}{100}$

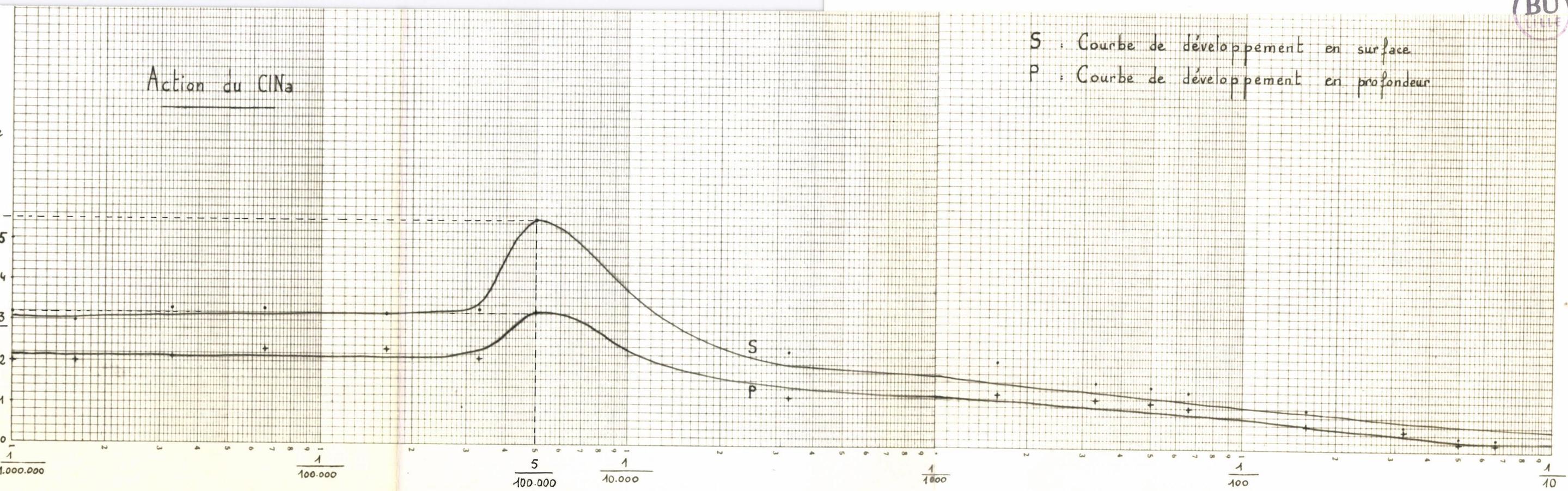
$\frac{1}{10}$

S

P

S : Courbe de développement en surface
P : Courbe de développement en profondeur

Concentration en CINa



RESULTATS

Nous constatons que, pour des concentrations du milieu en ClNa inférieures à 3/100.000, le développement du Perabacterium reste approximativement identique à celui obtenu en milieu dépourvu de ClNa : nous obtenons environ 3 bactéries par unité pour des prélèvements de surface et 2 bactéries par unité pour des prélèvements effectués en profondeur. A ces concentrations, le chlorure de sodium est donc pratiquement sans effet sur la croissance du Perabacterium.

Le développement optimum :

5 bactéries par unité pour des prélèvements de surface

3 bactéries par unité pour des prélèvements de profondeur

est obtenu pour une concentration de 5/100.000, au-delà de laquelle la courbe de développement décroît.

Et il apparaît très nettement que pour une concentration supérieure à 3/10.000, le chlorure de sodium exerce une action fortement inhibitrice sur le développement du Perabacterium.

VIII. ACTION DU SULFATE DE MANGANESE
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Nous recherchons l'influence de la concentration du milieu de culture en sulfate de manganèse, sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la préparation des tubes de culture :

- une solution saline standard de Winogradsky, dépourvue de sulfate manganèse, dont la composition est la suivante :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mg	2,5 g
$ClNa$	2,5 g
$(SO_4)_3Fe_2$	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution de Winogradsky modifiée, sans sulfate de manganèse, constituée comme suit :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mg	2,5 g
$ClNa$	2,5 g
SO_4Fe	0,05 g
eau	1.000 cc

- des solutions de SO_4Mn aux 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10
- un bouillon de pommes de terre
- une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

- 1 cc de solution de Winogradsky dépourvue de SO_4Mn
- 1 cc de solution de Winogradsky modifiée, dépourvue de SO_4Mn
- 3 cc de bouillon de pommes de terre
- 3 cc de solution de peptone

constituant 8 cc auxquels sont ajoutés le CO_3Ca et les solutions de SO_4Mn et eau, pour réaliser, dans les différents tubes, des concentrations en SO_4Mn régulièrement croissantes, comme l'indique le tableau suivant.

	SO ₄ Mn	EAU	CONCENTRATION EN SO ₄ Mn
tube 0		22 cc	nullie
tube 1	$\frac{1}{2}$ cc	24,5 cc	$\frac{1,6}{1.000.000}$
tube 2	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000.000}$
tube 3	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000.000}$
tube 4	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{100.000}$
tube 5	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 6	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{100.000}$
tube 7	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 8	3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100.000} \neq \frac{1}{10.000}$
tube 9	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{10.000}$
tube 10	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{1.000}$
tube 11	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 12	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{1.000}$
tube 13	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{1.000}$
tube 14	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 15	5 cc	17 cc	$\frac{1,66}{100}$
tube 16	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100}$
tube 17	15 cc	7 cc	$\frac{4,98}{100}$
tube 18	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{100}$

Pour le tube témoin X, la concentration en SO₄ Mn est de $\frac{3,3}{1.000.000}$



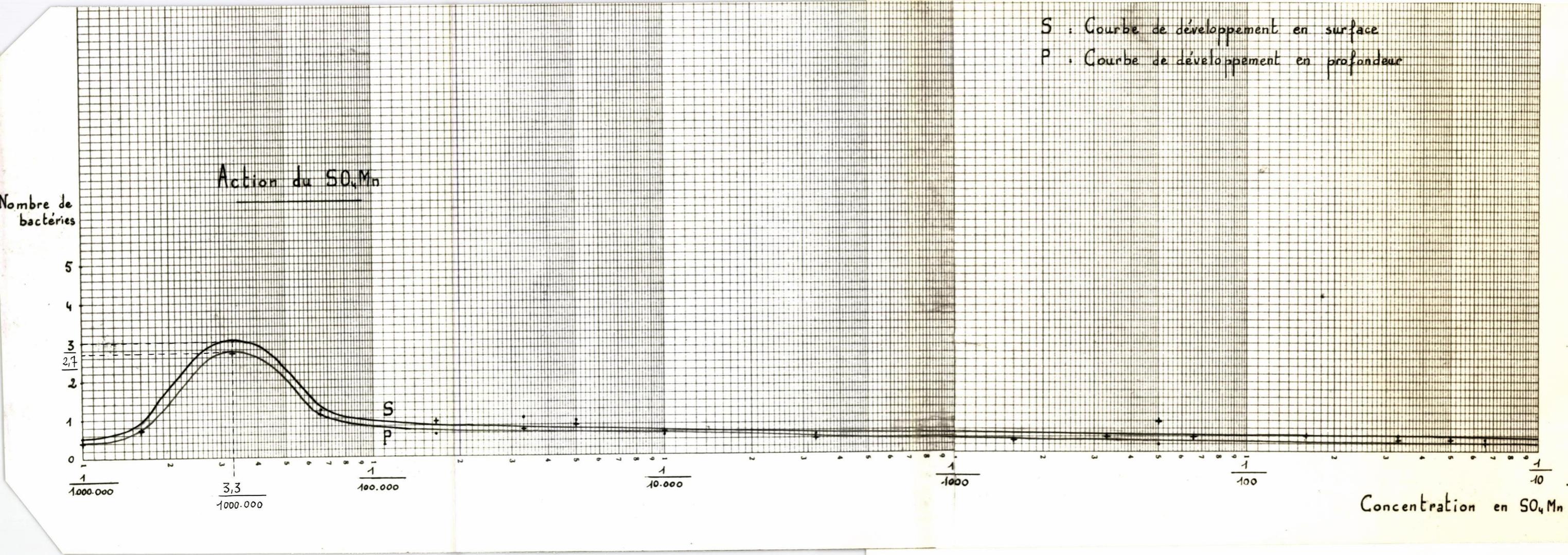
ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN SO ₄ l/m	RAPPORT IONS Cl ⁻ IONS SO ₄ ⁻	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 0		2,01	1-1-0-0-1-0-0-1-0-0-0- 1-0-1-1-0-0-1-0-0-	0,3 0,4	0-1-0-0-1-0-2-0-0-1-	0,4
tube 1	$\frac{1,6}{1.000.000}$	2,00	1-0-0-2-0-0-0-1-1-1-3-1- 2-1-0-0-2-1-0-1-0- 1-0-1-0-0-0-3-0-1-	0,8 0,7 0,6	1-1-0-1-0-0-1-1-2-0-2- 1-0-0-0-1-1-0-1-2-1-	0,7 0,7
tube 2	$\frac{3,3}{1.000.000}$	1,98	4-4-1-2-3-1-3-3-3-4-5- 5-5-2-3-2-2-1-3-3-4-4-	3 3,1	3-2-1-3-6-4-0-2-	2,7
tube 3	$\frac{6,6}{1.000.000}$	1,95	1-3-0-1-3-2-0-0-2-0-2-1-1-0- 1-1-2-1-1-0-1-1-0-1-2-3-0-	1 1,1	0-3-1-0-2-2-1-1-2-0-	1,2
tube 4	$\frac{1,65}{100.000}$	1,80	0-0-1-0-0-1-0-2-1-0-1-1-	0,6	0-2-1-1-1-1-0-1-1-1-	0,9
*tube 5	$\frac{3,3}{100.000}$	1,70	3-1-0-1-2-0-1-0-1-1-0-1- 1-2-0-1-0-1-2-1-0-2-	0,9 1	1-1-0-1-3-0-1-0-0-	0,7
tube 6	$\frac{4,95}{100.000}$	1,60	0-1-0-3-1-0-1-0-2-0- 2-3-0-1-0-1-0-1-0-	0,8 0,9	0-5-0-2-1-0-0-0-1-0-0-	0,8
*tube 7	$\frac{3,3}{100.000}$	1,70	0-2-1-3-0-5-0-0-0-2-1-0- 3-1-0-3-1-2-0-0-1-0-	1,1 1	1-0-1-1-3-1-0-0- 1-0-1-2-0-1-0-2-	0,9 0,8
tube 8	$\frac{9,9}{100.000}$	1,30	0-0-0-1-0-1-2-0-0-2-1-	0,5	0-4-1-0-0-1-1-0-0-0-0-	0,6
tube 9	$\frac{3,3}{10.000}$	0,70	0-1-1-1-0-0-1-0-1-1-0-	0,5	1-0-0-0-1-2-0-0-0-0-	0,4
tube 10	$\frac{1,65}{1.000}$	0,24	1-0-0-0-1-0-0-0-1-0-	0,3	0-1-0-1-0-0-1-0-0-0-	0,3
*tube 11	$\frac{3,3}{1.000}$	0,12	1-1-0-0-0-1-0-0-0-2- 1-1-0-0-0-1-0-0-0-2-	0,4	0-1-2-1-0-0-0-0-0-0-	0,4
tube 12	$\frac{4,95}{1.000}$	0,08	0-0-1-0-0-0-0-0-1-	0,2	1-0-0-1-0-1-0-2-1-	0,6
tube 13	$\frac{6,6}{1.000}$	0,06	0-2-1-1-0-0-1-0-0-0-0- 0-2-1-1-0-0-1-0-0-0-0-	0,4	1-0-0-1-0-1-0-0-0-1-	0,4
*tube 14	$\frac{3,3}{1.000}$	0,12	0-0-1-0-1-0-0-2-0-1-	0,5	0-0-1-0-1-0-1-0-0-0-	0,3
tube 15	$\frac{1,66}{100}$	0,02	0-0-0-1-2-0-0-1-0-0- 0-0-0-1-2-0-0-1-0-0-	0,4	0-1-0-0-1-0-2-0-0-0-	0,4
tube 16	$\frac{3,3}{100}$	0,013	0-0-1-0-0-0-0-2-0-1-	0,4	0-1-0-0-2-0-0-0-	0,3
tube 17	$\frac{4,98}{100}$	0,009	0-0-2-0-0-1-0-0-0-0- 0-0-2-0-0-1-0-0-0-0-	0,3	1-0-0-0-1-0-1-0-0-0-	0,3
tube 18	$\frac{6,6}{100}$	0,006	0-0-1-0-1-0-0-1-0-0- 0-0-1-0-1-0-0-1-0-0-	0,3	1-0-0-0-1-0-0-0-0-	0,2
tube X	$\frac{3,3}{1.000.000}$		4-2-3-0-5-4-3-3-5-3-	3,2	3-1-2-4-0-3-1-2-6-4-	2,6

COURBE

Représentation du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma,
en fonction de la concentration du milieu de culture en sulfate de manganèse.



RESULTATS

L'étude des courbes obtenues montre que le sulfate de manganèse a une action inhibitrice sur le développement du *Perabacterium* lorsqu'il est introduit dans les milieux de culture à des concentrations supérieures à 6/1.000.000 : nous obtenons moins d'une bactérie par unité de surface de la cellule de Thoma.

Pour des concentrations inférieures à 2/1.000.000, le développement de la bactérie est très peu important, compris entre :

- 0,5 bactérie par unité pour un milieu dépourvu de SO_4Mn
- 2 bactéries par unité pour une concentration de 2/1.000.000.

Le développement optimum :

- 3 bactéries par unité pour un prélèvement de surface
 - 2,7 bactéries par unité pour un prélèvement effectué en profondeur
- est obtenu pour une concentration en SO_4Mn égale à 3,3/1.000.000, concentration qui est celle du SO_4Mn dans le tube témoin X pour lequel nous notons un développement du même ordre de grandeur.

L'aptitude du manganèse à favoriser la croissance du *Perabacterium*, s'il est présent à de telles doses, témoigne de son action en qualité d'oligo-élément.

IX. ACTION DU SULFATE FERREUX
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Nous recherchons l'influence de la concentration du milieu en sulfate ferreux, sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la préparation des tubes de culture :

- une solution saline standard de Winogradsky modifiée, dépourvue de sulfate ferreux, dont la composition est la suivante :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mg	2,5 g
$ClNa$	2,5 g
SO_4Mn	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution saline standard de Winogradsky constituée comme suit :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mg	2,5 g
$ClNa$	2,5 g
$(SO_4)_3Fe_2$	0,05 g
SO_4Mn	0,05 g
eau	1.000 cc

- des solutions de SO_4Fe aux concentrations de 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10
- un bouillon de pommes de terre
- une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

- 1 cc de solution saline standard de Winogradsky
- 1 cc de solution saline de Winogradsky modifiée, sans sulfate ferreux
- 3 cc de bouillon de pommes de terre
- 3 cc de peptone

constituant 8 cc auxquels sont ajoutées solutions de SO_4Fe et eau pour réaliser, dans les différents tubes, des concentrations croissantes en SO_4Fe . Nous effectuons l'apport de CO_3Ca .

Le *Perabacterium* étant une Ferrobactériale, l'étude de l'influence de la concentration du milieu en sel ferreux est particulièrement intéressante.

En effet, le milieu de culture est riche en carbonates apportés sous forme de CO_3Ca . Il s'établit un équilibre ionique entre CO_3Ca , $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$ et CO_2 . D'autre part, la présence de sel ferreux dans le milieu permet l'existence de Fe^{++} à l'état ionique. Il y a donc formation de carbonate de fer CO_3Fe . Ce carbonate de fer se décomposera en $\text{CO}_2 + \text{FeO}$, l'oxyde ferreux étant ensuite oxydé en oxyde ferrique avec apport d'énergie. Cette énergie est utilisée en très faible partie à la décomposition de CO_3Fe , le reste permet la réduction de CO_2 pour l'assimilation du carbone (bactérie chimiosynthétisante).

Nous avons, en conséquence, effectué un nombre de cultures plus grand que lors des séries précédentes. Après la détermination de la concentration en SO_4Fe , conduisant au développement optimal, nous avons constitué, de part et d'autre de cette dernière, des concentrations proches auxquelles correspondent des valeurs de développement qui nous permettent un tracé de courbe plus précis.

Certains tubes, reproduisant les mêmes concentrations, ont été préparés deux fois de façon à rendre possible une vérification des résultats.

Il convenait de veiller à ce que le sel ferreux soit introduit et persiste sous cet état lorsque nous constituons les milieux à ensemer. Toutes les précautions nécessaires ont donc été prises pour éviter la transformation du sulfate ferreux en sulfate ferrique, cette oxydation s'opérant très rapidement si récipients et tubes ne sont pas impeccablement nettoyés.

Les différentes concentrations sont obtenues comme l'indique le tableau suivant :

	SO ₄ Fe	EAU	CONCENTRATION EN SO ₄ Fe
tube 0		22 cc	nulle
tube 1	$\frac{1}{2}$ cc	21,5 cc	$\frac{1,6}{1.000,000}$
tube 2	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000,000}$
tube 3	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000,000}$
tube 4	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{100,000}$
tube 5	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100,000}$
tube 6	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{100,000}$
tube 7	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{1.000,000}$
tube 8	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{100,000}$
tube 9	3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100,000}$
tube 10	6 cc	16 cc	$\frac{2}{10,000}$
tube 11	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{10,000}$
tube 12	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{10,000}$
tube 13	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{1,000}$
tube 14	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{1,000}$
tube 15	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{1,000}$
tube 16	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{1,000}$
vérification du tube 14	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1,000}$
vérification du tube 16	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1,000}$
reproduit 2 fois	3 cc	19 cc	$\frac{1}{100}$
reproduit 2 fois	5 cc	17 cc	$\frac{1,66}{100}$
tube 20 _a	7 cc	15 cc	$\frac{2,3}{100}$
reproduit 2 fois	10 cc	20 cc	$\frac{3,3}{100}$
tube 21 _a	12 cc	10 cc	$\frac{4}{100}$
reproduit 2 fois	15 cc	7 cc	$\frac{4,98}{100} = \frac{5}{100}$
tube 22 _a	17 cc	5 cc	$\frac{5,6}{100}$
reproduit 2 fois	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{100}$
tube 23	21 cc	1 cc	$\frac{7}{100}$
tube 24	22 cc		$\frac{7,3}{100}$
tube 25			$\frac{8,3}{100}$
tube 26			$\frac{9,3}{100}$
tube 27			$\frac{1}{10}$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN SO ₄ Fe	RAPPORT F ₂₊₃ F ₃₊₄	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	M MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE SURFACE	MOYENNE
tube 0	0	0	0-0-0-0-0-2-0-0-0-0- 1-0-0-0-0-1-0-1-0-0-0-0-0-0-	0,2 0,2	0-0-0-0-0-1-2-0-1-2-0-0-0-0-0- 0-1-0-0-0-0-0-1-0-0-1-0-	0,3 0,2
tube 1	$\frac{1,6}{1,000,000}$	1,32	0-0-0-2-1-2-1-0-0-0-0-0-0- 0-1-3-0-0-1-0-1-	0,9 0,8	0-3-2-2-1-0-1-0-0-2-0-0- 3-0-0-2-0-1-0-2-0-0-1-0-	0,9 0,7 0,8
tube 2	$\frac{3,3}{1,000,000}$	2,64	0-3-0-1-0-1-2-3-2-1- 1-2-2-1-0-1-1-2-0-3-3-	1,3 1,4	0-2-0-1-0-0-0-2-0-1-2-1- 2-3-0-1-1-3-1-0-1-0-3-0-0-	0,7 1,1 0,9
tube 3	$\frac{6,6}{1,000,000}$	5,28	1-2-1-0-0-1-1-2-1- 4-0-1-2-0-0-0-5-2-	1 1,5	0-2-1-1-3-0-2-0-0-1-0-0-0-3-7-5- 3-2-2-1-0-0-1-1-3-1-2-	1,5 1,4
tube 4	$\frac{1,65}{100,000}$	13,20	0-2-1-1-0-2-3-0-3-4- 3-1-2-0-0-4-2-0-0-1-2-0-2-2-	1,6 1,4	0-0-0-1-4-0-0-0-2-3-3- 2-0-2-1-2-0-0-0-2-4-4-1-	1,2 1,5 1,3
tube 5	$\frac{3,3}{100,000}$	26,40	1-1-0-0-1-2-2-0-2-3-1-1-5- 4-1-2-0-1-0-4-2-2-0-0-2-	1,4 1,5	0-5-4-2-0-3-1-2-0-2-1-0- 0-3-1-0-0-1-2-1-2-1-2-2-4-	1,5 1,5
tube 6	$\frac{4,95}{100,000}$	39,60	4-0-0-2-2-3-1-2-2-0-1-4- 2-0-0-1-2-1-0-4-3-2-	1,7 1,5	2-2-2-0-1-2-0-4-0-1-0-1- 2-3-1-0-3-3-0-1-2-	1,5 1,5
tube 7	$\frac{6,6}{100,000}$	52,80	0-2-1-1-2-2-0-3- 0-2-4-1-3-2-0-	1,5 1,7	3-0-3-2-1-2-3-2-2-0-1- 2-3-1-2-4-1-2-0-3-1-1-2-	1,6
tube 8	$\frac{3,3}{100,000}$	26,40	0-0-1-3-3-2-1-2-0-3- 1-0-0-1-2-3-4-1-2-5-3- 1-2-1-3-3-2-3-2-1-2-1-	2 1,9	2-3-1-2-4-1-2-0-3-1-1-2- 5-3-1-0-2-1-3-2-1-2-4-	1,8
tube 9	$\frac{9,9}{100,000}$	79,20	4-3-2-0-1-3-2-3-4-3-2- 2-1-0-4-1-2-5-2-3-0-	2,4 2,1	7-0-4-2-0-0-0-5-2- 3-3-2-0-2-4-0-2-3-3-	2,3 2,1
tube 10	$\frac{2}{10,000}$	158,40	6-0-3-4-2-2-0-2-2-1-1-2-3-4-5-4- 5-1-2-3-1-1-0-6-4-1-0-0-4-1-	2,5 2,6	0-4-0-1-3-6-1-1-1-5- 0-3-2-4-2-3-4-4-6-0- 6-4-3-3-5-0-4-0-3-4-0-	2,2
tube 11	$\frac{3,3}{10,000}$	264	8-0-4-2-0-3-3-1-0-1-4- 3-1-2-4-3-2-2-6-2-0-5-0-2-	2,4 2,5	7-3-5-6-10-5-5-6- 6-4-5-5-4-6-8-9-	2,2
tube 12	$\frac{6,6}{1,000}$	528	4-5-3-3-3-1-0-2-2-3-3-2-1-3- 0-4-3-2-5-4-3-5-4-0-	2,5 3	6-5-7-7-8-5-1-3-6-9-8- 8-9-12-9-10-9-7-8-4-	2,8 3
tube 13	$\frac{1,65}{1,000}$	1,320	6-8-6-6-3-5-6-7-5-6-6-5- 8-6-6-6-3-6-5-8-6-	5,7 6	7-3-5-6-10-5-5-6- 6-4-5-5-4-6-8-9-	5,8 5,9
tube 14	$\frac{3,3}{1,000}$	2,640	10-7-8-8-9-9-7-6-9- 12-10-8-9-7-8-6-	8,1 8,6	8-9-12-9-10-9-7-8-4-	7,6 8,5
tube 15	$\frac{4,95}{1,000}$	3,960	8-8-6-7-1-6-9-8-8-9-6-4-2 8-7-6-7-9-1-4-7-1-3-1-4	9 9,5	8-10-8-7-10-6-8-10-5 8-6-8-10-8-11-7-10-	8 8,3
tube 16	$\frac{6,6}{1,000}$	5,280	5-6-6-7-6-8-8-7-6-3-7- 9-12-1-3-1-2-9-7-10-5-12-9- 12-9-10-1-3-8-9-10-11-	9,7 10,4	8-7-8-0-7-10-9-8-16 10-9-8-8-12-10-6-6-	8,8
tube 17	$\frac{3,3}{1,000}$	2,640	7-8-10-9-8-7-8-12-12-10- 11-10-7-12-10-9-10-8-	9 9,6	10-6-7-8-10-6-14-9- 10-9-8-8-12-10-6-6-	8,7
tube 18	$\frac{6,6}{1,000}$	5,280	12-1-3-1-5-10-1-4-1-6-1-5-11- 13-1-5-1-1-10-1-5-1-4-1-6-1-2-1-5-	13 13	10-1-1-4-1-5-8-10-9-10- 14-1-3-1-2-10-1-2-1-3-1-5-1-6-	10,9
tube 19	$\frac{1}{100}$	7,920	21-1-5-1-3-1-2-1-4-1-5-1-3-1-5-1-9-1-6-1-7- 20-1-8-1-5-1-6-1-6-1-7-1-5-1-8-	15,4 16	14-1-3-1-2-10-1-2-1-3-1-5-1-6- 11-1-0-1-2-1-3-1-7-1-5-9-1-0-1-2-	13 12,5
tube 20	$\frac{1,66}{100}$	13,200	8-5-1-4-1-3-8-1-5-6-1-3-1-2-8- 8-5-6-1-6-1-7-8-10-6-10-11-	10,2 9,6	6-5-1-6-8-7-1-6-1-0-9-6-8- 10-9-8-8-12-10-6-6-	9,1
tube 21	$\frac{3,3}{100}$	26,400	9-8-1-3-1-0-1-3-9-9-10-8-9-10- 10-9-8-1-1-2-1-2-1-2-8-9-1-4-	9,8 10	10-0-9-6-8-9-8-10-8- 9-10-9-8-12-6-9-9-	8,4 8,7
tube 22	$\frac{4,98}{100}$	39,600	13-1-3-1-5-10-1-4-1-6-1-5-11- 13-1-5-1-1-10-1-5-1-4-1-6-1-2-1-5-	13 13	10-1-1-4-1-5-8-10-9-10- 14-1-3-1-2-10-1-2-1-3-1-5-1-6-	10,9
tube 23	$\frac{6,6}{100}$	52,800	8-5-1-4-1-3-8-1-5-6-1-3-1-2-8- 8-5-6-1-6-1-7-8-10-6-10-11-	10,2 9,6	6-5-1-6-8-7-1-6-1-0-9-6-8- 10-9-8-8-12-10-6-6-	9,1
tube 24	$\frac{1,66}{100}$	13,200	9-9-9-8-10-1-5-8-11-9- 10-12-1-6-9-10-1-2-1-4-10-1-3-1-2 10-8-11-9-9-1-1-10- 9-9-1-2-1-3-9-1-0-8-10-1-5-1-4-	9,6	7-10-8-7-9-11-9-12-9- 12-10-9-1-4-1-3-9-10-11- 10-8-9-9-12-11-9-9- 10-1-3-1-2-11-9-1-3-1-2-	9,1
tube 25	$\frac{2,3}{100}$	18,480	13-1-4-1-7-1-1-3-1-4-1-2-1-3- 14-1-2-1-5-1-4-1-3-1-4-	13,3 13,6	12-10-9-1-4-1-3-9-10-11- 12-10-9-1-4-1-3-11-12-12- 10-1-3-1-2-11-9-1-3-1-2-	10,7
tube 26	$\frac{4}{100}$	31,680	13-1-4-1-5-1-2-1-4-1-5-1-3-1-4-1-6- 13-1-6-1-8-1-2-1-5-1-6-1-2-1-1-1-7-	14,1 14,4	10-1-3-1-2-11-9-1-3-1-2- 10-1-3-1-2-11-9-1-3-1-2-	11,4
tube 27	$\frac{5,6}{100}$	44,880	13-1-1-1-5-1-4-1-7-1-5-1-6-1-5- 18-1-4-1-6-1-8-1-7-1-1-1-5-	15,3 15,5	12-1-2-9-1-4-1-3-11-12-12- 10-9-1-1-1-3-1-2-9-10-11-	11,9
tube 28	$\frac{5,6}{100}$	39,600	12-1-1-10-9-10-1-4-1-1-1-4- 6-5-1-2-1-0-6-9-12-11-	11,3	16-8-7-10-11-1-3-1-2-9- 7-9-8-10-8-9-5-9-	9,6
tube 29	$\frac{7,3}{100}$	58,080	9-7-8-9-8-7-6-7-9- 9-8-7-6-9-10-7-8-9-	8	8-7-6-5-9-0-8-10- 7-8-6-8-7-8-9-4-10-	7,5
tube 30	$\frac{8,3}{100}$	65,500	9-8-7-6-9-10-7-8-9- 5-8-1-0-6-8-9-8-7-10-	8,1	7-8-6-8-7-8-9-4-10- 7-4-8-9-10-6-3-7-	7,6
tube 31	$\frac{1}{10}$	78,600	5-8-1-0-6-8-9-8-7-10- 1-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-	7,9	7-4-8-9-10-6-3-7- 0-1-0-0-0-0-0-1-2-0-1-2-0-0-0-0-	7

COURBE

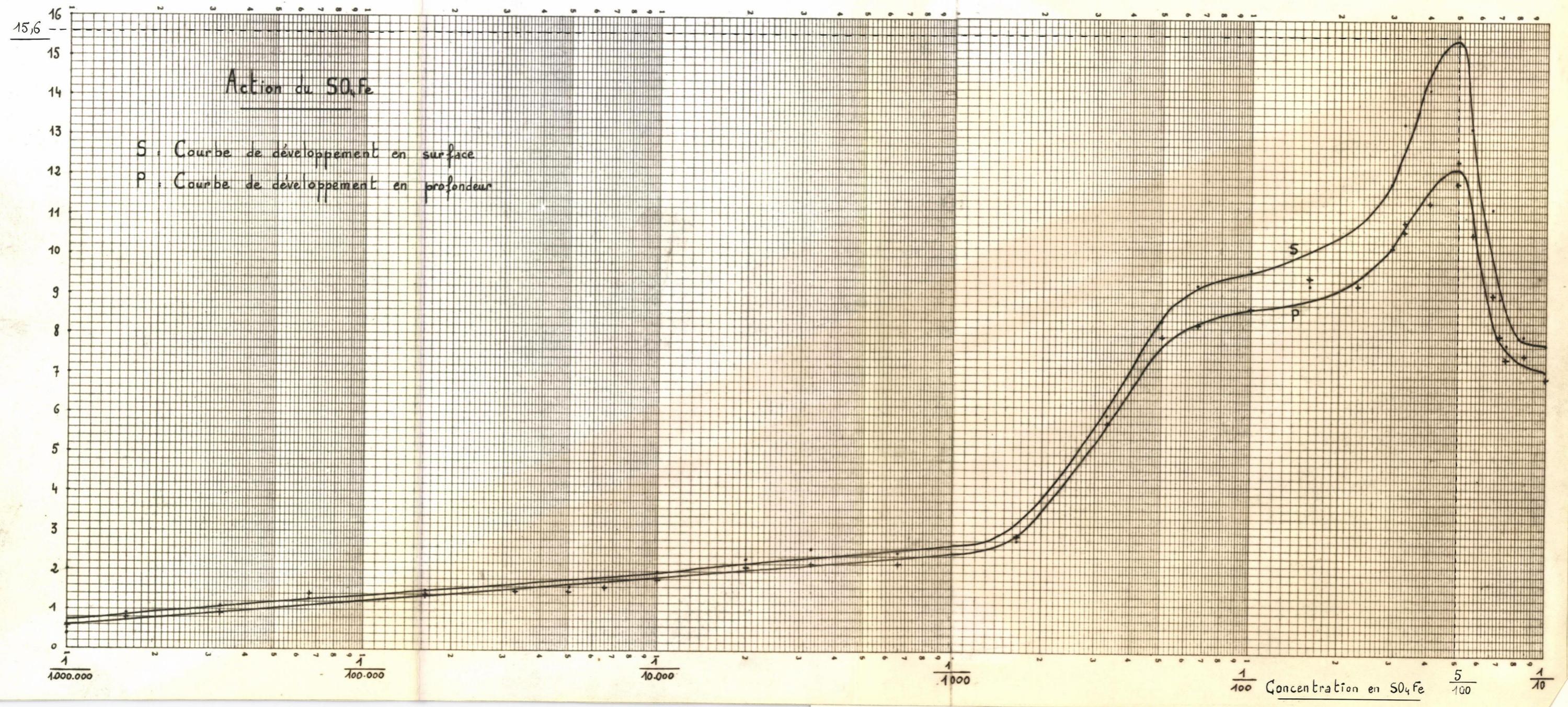
Représentation du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma,
en fonction de la concentration du milieu de culture en sulfate ferreux.



Nombre de bactéries

Action du SO_4Fe

S : Courbe de développement en surface
 P : Courbe de développement en profondeur



RESULTATS

L'examen des courbes tracées montre que :

- Lorsque la concentration du milieu de culture en sulfate ferreux varie entre $1/1.000.000$ et $1/1.000$, le nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma s'accroît régulièrement.

Nous notons :

un peu moins de 1 organisme par unité pour une concentration de

$1,6/1.000.000$

ce nombre atteint 2,8 pour une concentration de

$1,65/1.000$.

- Si les concentrations sont comprises entre $1/1.000$ et $5/1.000$, la pente des courbes augmente, témoignant d'un accroissement plus rapide du nombre de bactéries qui passe de 2,8 à plus de 8.

- La concentration en SO_4Fe croissant, le milieu continue à s'améliorer et un développement optimum du *Perabacterium* :

15,7 bactéries par unité pour un prélèvement de surface

12,5 bactéries par unité pour un prélèvement effectué en profondeur est obtenu pour une concentration en sel ferreux égale à $5/100$, au-delà de laquelle les milieux se montrent convenir de moins en moins bien à la bactérie.

X. ACTION DU SULFATE FERRIQUE
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI

Recherche de l'influence de la concentration du milieu en sulfate ferrique,
sur la croissance du Perabacterium.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la préparation des tubes de culture :

- une solution saline de Winogradsky dépourvue de sulfate ferrique,
dont la composition est la suivante :

$PO_4 HK_2$	5 g
$SO_4 Mg$	2,5 g
Cl Na	2,5 g
$SO_4 Mn$	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution saline de Winogradsky modifiée, constituée comme suit :

$PO_4 HK_2$	5 g
$SO_4 Mg$	2,5 g
Cl Na	2,5 g
$SO_4 Fe$	0,05 g
$SO_4 Mn$	0,05 g
eau	1.000 cc

- des solutions de $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}$ aux concentrations de 1/10.000, 1/1.000, 1/100 et 1/10
- un bouillon de pommes de terre
- une solution de peptone à 1 %.

COMPOSITION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés

- 1 cc de solution saline standard de Winogradsky sans $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$
- 1 cc de solution saline de Winogradsky modifiée
- 3 cc de bouillon de pommes de terre
- 3 cc de peptone

constituant 8 cc auxquels sont ajoutées eau et solutions de $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$, pour réaliser, dans les différents tubes, des concentrations croissantes en cette substance, comme l'indique le tableau suivant.

Nous effectuons l'apport de CO_3Ca .

	$(SO_4)_3Fe_2$	EAU	CONCENTRATION EN $(SO_4)_3Fe_2$
tube 0		22 cc	null
tube 1	$\frac{1}{2}$ cc	21,5 cc	$\frac{1,6}{1.000.000}$
tube 2	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000.000}$
tube 3	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000.000}$
tube 4	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{100.000}$
tube 5	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 6	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{100.000}$
tube 7	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{100.000}$
Vérification du tube 5 } tube 8	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{100.000}$
tube 9	3 cc	19 cc	$\frac{9,9}{100.000}$
tube 10	6 cc	16 cc	$\frac{2}{10.000}$
tube 11	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{10.000}$
tube 12	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{10.000}$
tube 13	5 cc	17 cc	$\frac{1,65}{1.000}$
tube 14	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
tube 15	15 cc	7 cc	$\frac{4,95}{1.000}$
tube 16	20 cc	2 cc	$\frac{6,6}{1.000}$
Vérification du tube 14 } tube 17	1 cc	21 cc	$\frac{3,3}{1.000}$
Vérification du tube 16 } tube 18	2 cc	20 cc	$\frac{6,6}{1.000}$
tube 19	3 cc	19 cc	$\frac{1}{100}$
tube 20	5 cc	17 cc	$\frac{1,6}{100}$
tube 21	10 cc	12 cc	$\frac{3,3}{100}$
tube 22	15 cc	7 cc	$\frac{4,98}{100}$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN (SD) ₄ Fe ₂	RAPPORT $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 0			0-1-3-1-0-0-1-0-1-1-3-0-0- 1-0-2-0-2-0-2-0-1-0-	0,8 0,7	0-1-2-1-0-0-0-1-2-0-1-0- 1-0-0-0-1-0-1-2-1-0-0-	0,6 0,5
tube 1	$\frac{1,6}{1.000.000}$	1,32	2-0-0-3-0-0-2-1-0-0- 0-1-1-0-2-0-0-1-2-0-0-	0,8 0,6	1-0-0-1-1-0-0-1-0-0- 1-0-1-0-0-1-2-0-0-1-1-0-	0,4 0,5
tube 2	$\frac{3,3}{1.000.000}$	$\frac{6,6}{10}$	0-1-0-1-2-0-0-1-2-0-1-0- 0-1-1-0-2-0-1-0-0-0-	0,6 0,5	1-0-0-0-1-2-0-1-0-1-0- 1-0-0-0-1-2-0-1-0-1-0-	0,5
tube 3	$\frac{6,6}{1.000.000}$	$\frac{3,3}{10}$	0-0-1-2-0-0-1-0-1-0-1-2- 0-2-1-2-0-0-1-0-1-1-	0,6 0,8	1-0-0-0-1-0-2-1-0-1-2-1- 0-0-1-2-0-0-0-1-0-1-1-	0,7 0,5
tube 4	$\frac{1,65}{100.000}$	$\frac{1,32}{10}$	0-1-0-1-2-0-2-0-0-1-2-0-2- 0-1-0-2-1-2-1-0-1-	0,8 0,9	0-3-1-0-0-1-1-0-1- 0-1-0-1-0-0-2-1-1-2-	0,7 0,8
* tube 5	$\frac{3,3}{100.000}$	$\frac{6,6}{100}$	1-0-0-1-4-1-1-0-0-1- 0-1-0-0-1-3-1-2-	0,9 0,8	0-3-0-0-1-0-2-0-1-0- 2-1-0-1-0-0-1-0-1-0-	0,7 0,6
tube 6	$\frac{4,95}{100.000}$	$\frac{4}{100}$	0-1-2-1-2-0-1-1-2-1-1-2- 0-1-2-0-0-2-1-1-1-	1,1 1	0-1-0-0-1-2-2-1-3-1-0-0- 3-2-1-0-1-2-0-2-0-1-	0,9 1,2
tube 7	$\frac{6,6}{100.000}$	$\frac{3,3}{100}$	0-1-0-2-0-1-3-1-0-0-2-3- 0-2-0-1-4-0-0-0-1-2-0-	1,1 0,9	0-2-0-1-1-0-1-0-1-3- 1-0-2-1-1-1-0-1-2-1-	0,9 1
* tube 8	$\frac{3,3}{100.000}$	$\frac{6,6}{100}$	0-1-1-1-0-2-1-1-1-2-0- 0-3-1-0-0-2-1-2-1-0-	0,9 1	1-2-0-1-1-1-0-1-1-0- 1-2-0-1-1-1-0-1-1-0-	0,8
tube 9	$\frac{9,9}{100.000}$	$\frac{2,2}{100}$	2-1-0-0-1-1-1-0-2-2-1- 1-3-1-0-1-1-0-2-2-	1 1,2	0-1-3-0-1-0-2-1-1-1- 0-1-3-0-1-0-1-0-2-1-0-	1 0,9
tube 10	$\frac{2}{10.000}$	$\frac{1,1}{100}$	0-1-1-0-0-1-3-2-1- 1-2-1-1-2-0-0-3-	1 1,2	0-3-1-1-0-1-0-2-1-0- 0-3-1-1-0-1-0-2-1-0-	0,9
tube 11	$\frac{3,3}{10.000}$	$\frac{6,6}{1.000}$	1-2-0-1-1-0-2-1-1- 0-3-0-2-1-1-2-1-2-	1 1,3	0-1-0-0-0-3-2-1-1-1- 1-1-0-2-3-1-0-1-1-1-	1 1,1
tube 12	$\frac{6,6}{10.000}$	$\frac{3,3}{1.000}$	1-0-1-1-0-2-3-1-1- 1-1-0-1-2-1-1-0-	1,1 1,3	1-1-0-2-3-1-0-1-1-1- 1-1-0-2-3-1-0-1-1-1-	1,1 1,1
tube 13	$\frac{1,65}{1.000}$	$\frac{1,32}{1.000}$	1-1-0-1-0-2-1-2-1-1-1- 1-2-1-1-2-3-1-1-2-2-1-2-	1 1,5	1-1-1-0-1-1-2-0-1-1- 1-1-1-0-1-1-2-0-1-1-	1 1,2
* tube 14	$\frac{3,3}{1.000}$	$\frac{6,6}{10.000}$	3-1-2-1-1-0-0-1-1-2-1-0- 1-0-0-1-2-1-1-1-	1,1 1	3-2-1-0-1-2-0-1- 1-1-1-0-1-1-2-0-1-1-	1,2 1
tube 15	$\frac{4,95}{1.000}$	$\frac{4,4}{10.000}$	1-1-1-2-1-2-1-0-1-1-0- 1-1-1-2-1-2-1-0-1-1-0-	1	2-1-1-2-0-2-1-1- 2-1-1-2-0-2-1-1-	1,2
tube 16	$\frac{6,6}{1.000}$	$\frac{3,3}{10.000}$	1-1-1-0-0-1-1-2-3-0-1- 1-1-1-0-0-1-1-2-3-0-1-	1	1-2-1-1-2-1-0-1-2-0- 1-2-1-1-2-1-0-1-2-0-	1,1
* tube 17	$\frac{3,3}{1.000}$	$\frac{6,6}{10.000}$	2-0-1-0-2-0-1-0-3-2-1- 2-0-1-0-2-0-1-0-3-2-1-	1,1	2-1-1-2-0-1-2-1-0-1- 2-1-1-2-0-1-2-1-0-1-	1,1
tube 18	$\frac{6,6}{1.000}$	$\frac{3,3}{10.000}$	1-0-1-1-0-1-2-1-2- 1-0-1-1-0-1-2-1-2-	1	2-2-0-1-2-0-1-1-1- 2-2-0-1-2-0-1-1-1-	1,1
tube 19	$\frac{1}{100}$	$\frac{2,2}{10.000}$	1-0-0-1-2-1-2-1-0-1- 1-0-0-1-2-1-2-1-0-1-	0,9	1-1-1-0-2-3-1-0-1-1- 1-1-1-0-2-3-1-0-1-1-	1,1
tube 20	$\frac{1,65}{100}$	$\frac{1,32}{10.000}$	2-1-2-0-1-2-0-1-1- 2-1-2-0-1-2-0-1-1-	1,1	2-0-2-1-3-1-1-1-0-2-1- 2-0-2-1-3-1-1-1-0-2-1-	1,2
tube 21	$\frac{3,3}{100}$	$\frac{6,6}{100.000}$	1-0-0-2-3-0-1-0-0-1-1-1- 1-0-0-2-3-0-1-0-0-1-1-1-	0,8	1-1-1-0-1-1-2-1- 1-1-1-0-1-1-2-1-	1
tube 22	$\frac{4,98}{100}$	$\frac{4,4}{100.000}$	1-2-3-2-1-2-1-1-0- 1-2-3-2-1-2-1-1-0-	1,5	2-1-0-1-0-1-2-2-1-0-1- 2-1-0-1-0-1-2-2-1-0-1-	1
tube 5 bis	$\frac{3,3}{100.000}$	$\frac{6,6}{100}$	0-2-3-1-0-0-1- 0-2-3-1-0-0-1-	1	1-0-2-0-0-3-0-0-1-1- 1-0-2-0-0-3-0-0-1-1-	0,8
tube 13 bis	$\frac{1,6}{1.000}$	$\frac{1,32}{1.000}$	0-1-2-2-2-0-1-1-0-2-1- 0-1-2-2-2-0-1-1-0-2-1-	1,1	1-0-0-2-0-2-0-1-1-1- 1-0-0-2-0-2-0-1-1-1-	0,8
tube 17 bis	$\frac{3,3}{1.000}$	$\frac{6,6}{10.000}$	0-1-0-1-2-3-0-0-1- 0-1-0-1-2-3-0-0-1-	0,9	1-0-1-1-0-2-1-2-0-1- 1-0-1-1-0-2-1-2-0-1-	0,9
tube 18 bis	$\frac{6,6}{1.000}$	$\frac{3,3}{10.000}$	0-1-2-0-1-1-2-1-1-1- 0-1-2-0-1-1-2-1-1-1-	1	0-0-1-1-1-0-2-1-0-2- 0-0-1-1-1-0-2-1-0-2-	0,8
tube 21 bis	$\frac{3,3}{100}$	$\frac{6,6}{100.000}$	2-1-2-0-1-2-0-2-1-1- 2-1-2-0-1-2-0-2-1-1-	1,2	0-1-1-0-2-3-1-1-1- 0-1-1-0-2-3-1-1-1-	1,1
tube 22 bis	$\frac{4,98}{100}$	$\frac{4,4}{100.000}$	0-1-2-1-0-1-2-1- 0-1-2-1-0-1-2-1-	1	0-1-0-2-1-2-1-0- 0-1-0-2-1-2-1-0-	0,8

COURBE

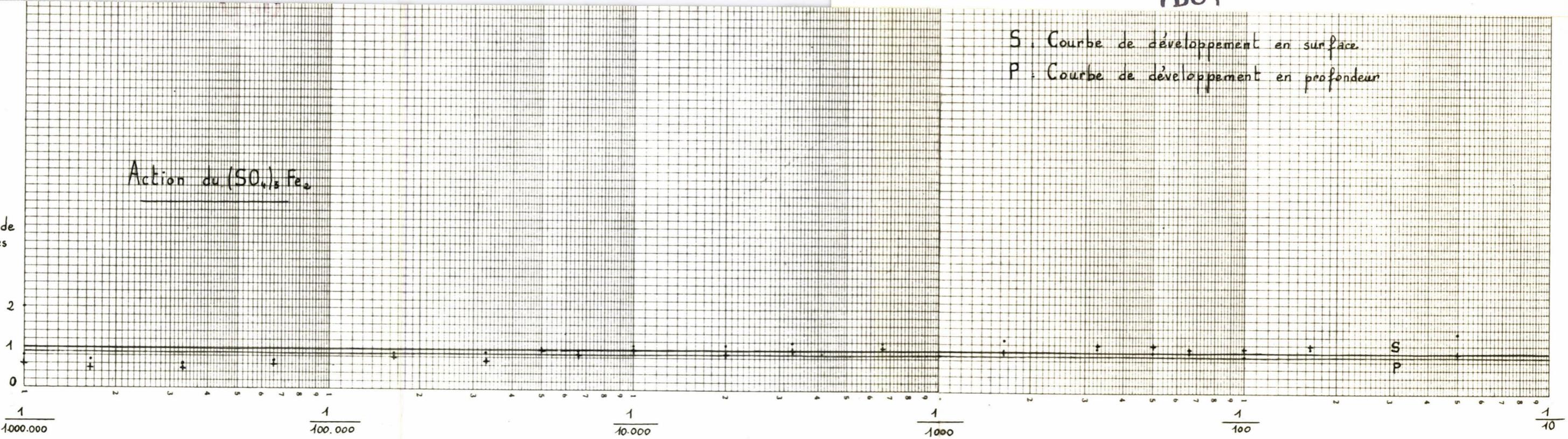
Représentation du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma,
en fonction de la concentration du milieu de culture en sulfate ferrique.

J
-LE

BU

Action du $(SO_4)_3 Fe_2$

Nombre de bactéries



S : Courbe de développement en surface.
P : Courbe de développement en profondeur

Concentration en $(SO_4)_3 Fe_2$

RESULTATS

Nous avons étudié le développement du *Perabacterium spelei* sur des milieux dont les concentrations en sulfate ferrique s'échelonnaient entre 1/100.000 et 5/100.

Les divers développements obtenus se situent tous autour des valeurs moyennes de :

- 1 bactérie par unité pour les prélèvements effectués en surface
- 0,9 bactérie par unité pour les prélèvements de profondeur.

Les écarts existant entre les différentes valeurs et leur moyenne sont presque toujours inférieurs à 0,3 bactéries et, par conséquent, peuvent être imputés aux erreurs expérimentales.

L'organisme se développe de façon identique quelle que soit la quantité de $(SO_4)_3Fe_2$ introduite dans le milieu de culture.

Cependant, il faut tenir compte du rapport existant entre ions Fe^{++} et ions Fe^{+++} , rapport conditionnant le potentiel d'oxydo-réduction du milieu de culture. Au cours de cette série d'essais nous avons préparé des milieux pour lesquels le rapport entre ions ferreux et ferriques $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$ variait entre 1,32 et 4,4/100.000. Ces rapports ne fournissent pas les conditions favorables de développement du *Perabacterium* puisque nous obtenons seulement, en moyenne, une bactérie par unité de Thoma, alors que lors des essais de culture faits précédemment pour la recherche de l'action du sulfate ferreux, nous avons obtenu des développements plus importants, les rapports $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$ ayant varié entre 1,32 et 78.600.

XI. ETUDE DES EQUILIBRES IONIQUES
FAVORABLES AU BON DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

A. DETERMINATION DU MEILLEUR RAPPORT IONIQUE $\frac{Cl^-}{SO_4^{--}}$

Lors des séries de cultures ayant pour but d'étudier, tour à tour, les actions des différents sels minéraux constitutifs de la solution saline de Winogradsky, nous avons relié le nombre de bactéries obtenu à la concentration du milieu en la substance étudiée.

La connaissance de ces valeurs, permettant un développement optimum lors des diverses séries d'essais, n'était pas suffisante pour nous conduire à la constitution du milieu le plus apte à la culture du Perabacterium. En effet, il nous fallait connaître les valeurs des équilibres ioniques à respecter. Les apports étant faits surtout sous forme de chlorures et de sulfates, il est apparu intéressant de rechercher les valeurs des rapports $\frac{\text{ions } Cl^-}{\text{ions } SO_4^{--}}$.

Dans tous les tubes préparés pour la recherche de l'action du PO_4HK_2 , les sulfates et chlorures figuraient en quantité inchangée, laissant fixe et égale à 2, la valeur ionique $\frac{Cl^-}{SO_4^{--}}$.

Mais, en introduisant dans les milieux, sulfate de magnésium, chlorure de sodium et sulfate de manganèse, en plus ou moins grandes quantités, lors des séries d'essais successifs, nous avons créé, entre ions, des rapports très variables qui ont été calculés et figurent dans les tableaux précédemment présentés. Ils varient entre :

5/1.000 et 63 pour les essais portant sur l'étude du SO_4Mg

1/100 et 780 pour les essais portant sur l'étude du $ClNa$

6/1.000 et 2 pour les essais portant sur l'étude du SO_4Mn .

Nous avons relevé les valeurs des concentrations et du rapport $\frac{Cl^-}{SO_4}$ ayant conduit aux meilleurs développements lors des cultures effectuées :

SUBSTANCE ETUDIEE	CONCENTRATION AYANT CONDUIT AU DEVELOPPEMENT MAXIMUM	RAPPORT $\frac{Cl^-}{SO_4}$	DEVELOPPEMENT EN SURFACE	DEVELOPPEMENT EN PROFONDEUR
SO_4Mg	$\frac{1,65}{1.000}$	0,2	9,3	9
$ClNa$	$\frac{5}{100.000}$	0,57	5,5	3
SO_4Mn	$\frac{3,3}{1.000.000}$	2	3	2,7

Le SO_4Mn s'est montré jouer le rôle d'oligo-élément : c'est donc essentiellement sa présence à la faible concentration d'environ 3,3/1.000.000 qui est déterminante d'un bon développement du *Perabacterium*.

Le $ClNa$ étant très vite inhibiteur - à partir d'une concentration de 3/10.000 - le rapport $\frac{Cl^-}{SO_4} = 0,57$ n'a pas paru pouvoir être choisi comme valeur à retenir pour la préparation ultérieure du milieu de culture amélioré.

Lors de l'étude de l'action du SO_4Mg , le meilleur développement :

9,3 bactéries pour le prélèvement de surface

9 bactéries pour le prélèvement de profondeur

a été obtenu pour la concentration de 1,65/1.000 à laquelle correspondait le rapport $\frac{Cl^-}{SO_4} = 0,20$, tandis que l'ensemencement d'un milieu de concentration 3,3/1.000 et de

rapport $\frac{Cl^-}{SO_4} = 0,10$, nous permettait d'obtenir :

8,8 bactéries pour le prélèvement en surface

7,8 bactéries pour le prélèvement de profondeur.

Ces deux milieux se sont montrés assez favorables à la culture effectuée, le nombre d'organismes ayant doublé par rapport à celui que nous déterminions dans le tube témoin X.

L'équilibre entre ions Cl^- et SO_4 le plus favorable au bon développement de *Perabacterium* apparaît exister lorsque le rapport $\frac{Cl^-}{SO_4}$ est voisin de 0,20 ou compris entre 0,10 et 0,20.

Aussi cet équilibre sera-t-il maintenu entre chlorures et sulfates constitutifs des milieux de culture préparés ultérieurement.

B. CHOIX DES CATHIONS A INTRODUIRE DANS LES MILIEUX DE CULTURE

Un autre problème se posait : sous forme de quels sels nous fallait-il introduire sulfates et chlorures ?

Dans la solution saline de Winogradsky figurent :

- chlorure de sodium
- et sulfates de magnésium, de manganèse et de fer.

Mais peut-être l'adjonction d'autres chlorures ou d'autres sulfates aux milieux de culture permettrait-elle de les améliorer.

Nous avons donc procédé à des ensemencements sur substrats où étaient présents, outre le sulfate de manganèse et les sulfates de fer des solutions de Winogradsky, l'un des chlorures et l'un des sulfates suivants :

KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂

et SO₄K₂, SO₄Na₂, SO₄Mg

introduits deux à deux pour des essais successifs.

EXPOSE DE CES ESSAIS

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la constitution des tubes de culture :

- une solution saline de Winogradsky dépourvue de ClNa et de SO₄Mg et que nous avons appelée solution A.

Sa composition est la suivante :

PO ₄ HK ₂	5 g
SO ₄ Mn	0,05 g
(SO ₄) ₃ Fe ₂	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution saline de Winogradsky modifiée, dépourvue de ClNa et de SO₄Mg, appelée solution B et constituée comme suit :

PO ₄ HK ₂	5 g
SO ₄ Fe	0,05 g
SO ₄ Mn	0,05 g
eau	1.000 cc

- des solutions au 1/1.000 de KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂
et de SO₄K₂, SO₄Na₂ et SO₄Mg

- une solution de peptone à 1 %

- un bouillon de pommes de terre.

CONSTITUTION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

1 cc de solution A

1 cc de solution B

3 cc de solution de peptone

3 cc de bouillon de pommes de terre

constituant 8 cc auxquels sont ajoutées eau et solutions de chlorures et sulfates en quantités telles que, dans chaque tube, existe un rapport $\frac{Cl^-}{SO_4} = \text{égal à } 0,2$. Nous effectuons toujours l'apport de CO_3Ca dans le milieu.

Nous avons donc constitué une série de milieux de culture pour lesquels le rapport ionique $\frac{Cl^-}{SO_4}$ est maintenu constant et égal à la valeur établie de 0,20.

Ces milieux ne diffèrent que par l'apport de divers cations dont nous recherchons les effets sur le développement du Perabacterium.

	CHLORURE	SULFATE	EAU
tube 1	sol. de KCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4Na_2 à $\frac{1}{1.000} = 9$ cc	12 cc
tube 2	sol. de KCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4K_2 à $\frac{1}{1.000} = 11$ cc	10 cc
tube 3	sol. de KCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4Mg à $\frac{1}{1.000} = 8$ cc	13 cc
tube 4	sol. de NaCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4Na_2 à $\frac{1}{1.000} = 12$ cc	9 cc
tube 5	sol. de NaCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4Na_2 à $\frac{1}{1.000} = 15$ cc	6 cc
tube 6	sol. de NaCl à $\frac{1}{1.000} = 1$ cc	sol. de SO_4Mg à $\frac{1}{1.000} = 10$ cc	11 cc
tube 7	sol. de $MgCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4Na_2 à $\frac{1}{1.000} = 7$ cc	14,5 cc
tube 8	sol. de $MgCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4K_2 à $\frac{1}{1.000} = 8$ cc	13,5 cc
tube 9	sol. de $MgCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4Mg à $\frac{1}{1.000} = 6$ cc	15,5 cc
tube 10	sol. de $CaCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4Na_2 à $\frac{1}{1.000} = 6$ cc	15,5 cc
tube 11	sol. de $CaCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4K_2 à $\frac{1}{1.000} = 8$ cc	13,5 cc
tube 12	sol. de $CaCl_2$ à $\frac{1}{1.000} = \frac{1}{2}$ cc	sol. de SO_4Mg à $\frac{1}{1.000} = 5$ cc	16,5 cc



ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

$$\frac{CI_1}{SO_4} = 0,2$$

	CONCENTRATIONS MOLECULAIRES	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 1	$\left\{ \begin{array}{l} CIK \frac{3}{100.000} \\ SO_4 Na_2 \frac{3}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1-0-0-1-1-0-0-1-0-0- \\ 2-0-0-0-0-0-1-0- \end{array} \right.$	0,4 0,3	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-2-1-0-1-0-0-1-0- \\ 1-0-0-1-0-1-0-0-1- \end{array} \right.$	0,6 0,5
tube 2	$\left\{ \begin{array}{l} CIK \frac{3}{100.000} \\ SO_4 K_2 \frac{3}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1-0-0-1-0-0-0-2-1-1- \\ 1-0-0-1-0-0-0-2-0-1- \end{array} \right.$	0,6 0,5	$\left\{ \begin{array}{l} 2-0-0-1-0-1-0-0-0-0- \\ 1-0-2-0-0-1-0-0-1- \end{array} \right.$	0,3 0,5
*tube 3	$\left\{ \begin{array}{l} CIK \frac{3}{100.000} \\ SO_4 Mg \frac{2,6}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-2-2-1-1-2-1-0-3-2- \\ 1-0-0-2-2-1-2-0-1-3- \end{array} \right.$	1,4 1,2	$\left\{ \begin{array}{l} 1-1-0-2-1-0-0-0-1-2- \\ 3-0-1-0-1-1-0-0-0-1-2-2- \end{array} \right.$	0,8 0,9
tube 4	$\left\{ \begin{array}{l} CI Na \frac{3}{100.000} \\ SO_4 Na_2 \frac{4}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-0-1-0-0-0-1-0-1- \\ 1-0-1-0-1-0-0-1- \end{array} \right.$	0,3 0,5	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-1-0-0-1-0-0-2-0- \\ \end{array} \right.$	0,5
tube 5	$\left\{ \begin{array}{l} CI Na \frac{3}{100.000} \\ SO_4 K_2 \frac{5}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-0-1-0-0-0-1-2-0-0-0- \\ \end{array} \right.$	0,4	$\left\{ \begin{array}{l} 1-0-0-1-0-0-1-0-1-1- \end{array} \right.$	0,5
tube 6	$\left\{ \begin{array}{l} CI Na \frac{3}{100.000} \\ SO_4 Mg \frac{3}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1-0-1-0-0-0-0-0-0-1- \\ 1-2-0-0-0-1-0-0-0-1- \end{array} \right.$	0,3 0,5	$\left\{ \begin{array}{l} 2-0-0-0-1-0-0-0-0-0- \\ 1-0-0-0-0-0-2-1-0-0- \end{array} \right.$	0,3 0,4
tube 7	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Mg \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 Na_2 \frac{2}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-0-0-1-0-0-2-0-0-1- \\ 0-0-1-0-0-0-1-2-0-3-0-0- \end{array} \right.$	0,4 0,6	$\left\{ \begin{array}{l} 0-0-1-0-0-1-0-0-0-1- \\ 0-0-1-0-1-0-0-2-0-1- \end{array} \right.$	0,3 0,5
tube 8	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Mg \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 K_2 \frac{2,5}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1-0-0-1-0-1-0-0-1-3- \\ 0-0-1-0-2-0-0-1-0-2- \end{array} \right.$	0,7 0,6	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-2-0-0-1-0-1-0-1- \\ \end{array} \right.$	0,6
tube 9	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Mg \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 Mg \frac{2}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-2-0-1-1-2-1-0-0-1- \\ 2-0-1-0-1-2-0-0-2-1- \end{array} \right.$	0,8 0,9	$\left\{ \begin{array}{l} 0-0-2-0-1-1-1-2-0-1- \\ 0-1-2-0-1-0-1-0-1-1- \end{array} \right.$	0,8 0,7
tube 10	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Ca \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 Na_2 \frac{2}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-0-2-1-2-0-0-0-2- \\ 0-1-0-2-0-0-1-1-0-1- \end{array} \right.$	0,8 0,6	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-0-1-2-0-0-1-0-2- \\ \end{array} \right.$	0,7
tube 11	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Ca \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 K_2 \frac{2,5}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2-0-0-1-2-1-0-0-1-2- \\ 0-0-1-1-2-1-1-0-0-1- \end{array} \right.$	0,9 0,7	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-1-0-1-2-1-1-0-1- \\ 2-0-0-0-2-0-1-0-1-1- \end{array} \right.$	0,8 0,7
tube 12	$\left\{ \begin{array}{l} CI_2 Ca \frac{1,5}{100.000} \\ SO_4 Mg \frac{1,6}{10.000} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1-2-0-1-1-0-1-0-0-1- \\ 1-0-0-2-0-1-2-0-1-1- \end{array} \right.$	0,7 0,8	$\left\{ \begin{array}{l} 0-1-0-1-1-2-0-1-1-1- \\ 0-2-1-1-0-0-0-1-1-0- \end{array} \right.$	0,8 0,6

INTERPRETATION DES RESULTATS

L'étude de ces résultats

- confirme l'action inhibitrice qu'exerce le sodium s'il n'est pas introduit dans le milieu à la concentration précédemment déterminée et voisine de 5/100.000. Les tubes 1, 4, 5, 6 et 7, où est présent le cation Na^+ , fournissent des développements très faibles, inférieurs à 0,5 bactérie par unité de Thoma.

- met en évidence l'action assez favorable qu'exerce le potassium lorsqu'il n'est pas en présence d'une dose inhibitrice de sodium, ainsi qu'en témoignent les tubes 2, 3, 8 et 11.

- met en évidence l'action favorable du magnésium : le tube 9 renfermant Cl_2Mg et SO_4Mg conduit à un développement de 0,9 bactérie par unité. Ce développement reste assez important quand Mg et Ca sont associés : le tube 12 fournit 0,7 à 0,8 bactérie par unité.

Ces constatations sont en accord avec l'existence du *Perabacterium* sur terrains dolomitiques où il a été repéré. En effet, la dolomie, formée d'un carbonate double de calcium et de magnésium, est apte à fournir à la bactérie des éléments et des associations ioniques favorables à son développement.

- fait apparaître que les meilleures conditions se trouvent réalisées lorsque sont réunis les cations K et Mg : le tube 3 renfermant KCl et SO_4Mg permet d'obtenir :

1,3 bactérie par unité pour un prélèvement de surface

0,9 bactérie par unité pour un prélèvement effectué en profondeur.

L'examen du tableau des résultats nous conduit donc à conclure que l'association des ions K et Mg est susceptible de fournir des conditions intéressantes de développement.

Nous allons maintenant rechercher sous quel rapport ces cations K et Mg doivent coexister dans les milieux de culture.

C. RECHERCHE DU MEILLEUR RAPPORT A ACCORDER AUX CATHIONS K ET Mg

La série de recherches précédentes montre que la présence d'ions K et Mg rend le milieu de culture favorable au bon développement du Perabacterium.

Mais quelles quantités de ces cathions faut-il introduire pour que soit réalisé, entre eux, le rapport le plus adéquat ?

Il convenait de procéder à une série d'essais nous permettant d'effectuer cette détermination, essais exposés ci-après.

MILIEUX UTILISES

Sont utilisés pour la constitution des tubes de culture :

- une solution A, établie précédemment, dont la composition est la suivante :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mn	0,05 g
$(SO_4)_3Fe_2$	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution B, déjà utilisée lors des essais précédents et constituée comme suit :

PO_4HK_2	5 g
SO_4Mn	0,05 g
SO_4Fe	0,05 g
eau	1.000 cc

- une solution de peptone à 1 %

- un bouillon de pommes de terre.

CONSTITUTION DES TUBES

Dans chacun des tubes sont portés :

- 1 cc de solution A
- 1 cc de solution B
- 3 cc de solution de peptone
- 3 cc de bouillon de pommes de terre

constituant 8 cc auxquels nous avons ajouté KCl et SO_4Mg en quantités telles que :

Le rapport du nombre total d'ions Cl^- présents, au nombre total d'ions

SO_4^{2-} , dans chacun des tubes, soit égal à 0,2 ;

ces conditions étaient réalisées lorsque nous introduisons une solution appelée solution type et telle que :

2 cc de solution de KCl à 1/100

soient ajoutées à 16 cc de solution de SO_4Mg à 1/100.

Diverses quantités de cette solution-type ont été ajoutées aux 8cc préexistants dans les tubes de culture. Ils y maintenaient un rapport $\frac{\text{Cl}^-}{\text{SO}_4^{2-}} = 0,2$; le rapport $\frac{\text{ions K}}{\text{ions Mg}}$ variant de la façon suivante :

	VOLUME DE LA SOLUTION TYPE AJOUTE AUX 8 cc INITIAUX	VOLUME D'EAU	RAPPORT $\frac{\text{IONS K}}{\text{IONS Mg}}$
tube 1	2 gouttes = $\frac{1}{10}$ cc	22 cc	20
tube 2	4 gouttes = $\frac{2}{10}$ cc	22 cc	8
tube 3	6 gouttes = $\frac{3}{10}$ cc	22 cc	5
tube 4	8 gouttes = $\frac{4}{10}$ cc	22 cc	4,3
tube 5	10 gouttes = $\frac{1}{2}$ cc	21,5 cc	3,5
tube 6	12 gouttes = $\frac{6}{10}$ cc	21,5 cc	3
tube 7	14 gouttes = $\frac{7}{10}$ cc	21,5 cc	2,5
tube 8	16 gouttes = $\frac{8}{10}$ cc	21 cc	2,3
tube 9	18 gouttes = $\frac{9}{10}$ cc	21 cc	2
tube 10	20 gouttes = 1 cc	21 cc	1,9

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

Résultats des comptages effectués.

	RAPPORT $\frac{\text{IONS K}}{\text{IONS Mg}}$	PRELEVEMENT EFFECTUE EN SURFACE NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EFFECTUE EN PROFONDEUR NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 1	20	2-3-2-0-3-1-2-0-1-2- 2-1-3-0-4-0-1-2-1-2-	1,6 1,5	4-2-1-1-0-1-3-2-1-1- 0-1-0-3-1-4-2-1-2-0-	1,6 1,4
tube 2	8	1-1-0-2-3-2-1-1- 3-1-2-1-1-2-1-1-2-	1,3 1,5	2-1-0-2-1-1-2-1- 1-0-3-2-1-2-1-0-2-1-	1,2 1,3
tube 3	5	0-2-1-1-0-3-4-2-1- 1-1-0-2-1-3-0-1-2-2-	1,4 1,3	1-0-2-3-1-0-3-1-2-0-	1,3
tube 4	4,3	3-3-0-1-4-1-2-0-1-2- 2-4-0-3-5-2-0-3-0-	1,7 1,9	1-2-4-0-2-1-3-1-2-1-	1,7
tube 5	3,5	3-5-4-5-7-6-4-4-6-6- 5-6-4-4-6-3-5-4- 5-3-4-4-5-6-6-5-7-6-	5 4,6 5,1	4-5-3-4-3-3-6-5- 4-5-3-6-2-8-5-4-	4,1 4,5
tube 6	3	2-2-3-4-3-2-0-4-0-2-	2,2	1-2-3-0-4-2-1-2-	1,8
tube 7	2,5	3-1-1-2-0-4-2-1-2-4- 1-2-2-5-0-4-2-1-2-0-	2 1,9	3-2-1-0-3-2-1-2-3-2-	1,9
tube 8	2,3	1-2-4-2-0-3-0-1-2-3-	1,8	2-2-3-1-0-2-1-2-1-3-	1,7
tube 9	2	0-1-2-0-2-1-1-1-3-4-	1,5	1-2-3-0-2-1-1-1-2-2-	1,5
tube 10	1,9	4-3-0-1-1-0-2-1-0-2-	1,4	1-2-4-2-0-1-1-0-2-1- 0-3-2-1-0-1-2-0-2-2-	1,4 1,3
tube X témoin		3-5-4-2-2-3-5-4-4-	3,5	6-3-3-1-2-5-4-1-	3

CONCLUSION

L'étude des résultats montre que le meilleur développement du Perabacterium
4,9 bactéries par unité pour le prélèvement de surface
4,3 bactéries par unité pour le prélèvement de profondeur
est obtenu pour le tube 5 pour lequel le rapport $\frac{\text{ions K}}{\text{ions Mg}}$ était égal à 3,5.

En conséquence, ce rapport sera respecté lors de la constitution du milieu de culture amélioré dans le bilan minéral qui va suivre.

D. ETUDE DE L'EQUILIBRE IONIQUE ENTRE SELS FERREUX ET FERRIQUE

Lors de l'étude de l'action du sulfate ferreux sur le développement du Perabacterium, les concentrations en SO_4Fe variaient entre 1,6/1.000.000 et 6,6/100, tandis que les rapports entre ions Fe^{++} et Fe^{+++} s'échelonnaient entre 1,32 et 52.800.

Les résultats ont montré que le développement maximum :

15,7 bactéries par unité pour un prélèvement de surface

12,5 bactéries par unité pour un prélèvement de profondeur

était obtenu pour une concentration de 5/100 à laquelle correspondait un rapport

$$\frac{\text{ions Fe}^{++}}{\text{ions Fe}^{+++}} = 39.600.$$

Quand nous établirons le milieu de culture le plus favorable au développement du Perabacterium, nous veillerons donc à ce que cet équilibre ionique soit maintenu.

XII. BILAN MINERAL

CONSTITUTION DU MILIEU DE CULTURE

Les essais précédents nous ont permis de déterminer quelles concentrations il convenait d'accorder aux sels minéraux constitutifs d'un milieu de culture favorable au bon développement du *Perabacterium* et quels équilibres ioniques devaient y être maintenus.

Rassemblant ces différents résultats, nous avons constitué un milieu de culture qui groupait les substances minérales en quantités et en rapports tels que les conditions optimum de développement soient réalisées :

Chaque tube de culture de 30 cc devait renfermer :

PO_4HK_2 à la concentration de 1/10.000 (comme dans le tube 8 des essais PO_4HK_2)

obtenue par l'apport de 3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000,

SO_4Mg à la concentration de 1,65/1.000 (comme dans le tube 2 des essais SO_4Mg)

obtenue par l'apport de 5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100,

ClNa à la concentration de 0,5/10.000 (comme dans le tube 6^e des essais ClNa)

obtenue par l'apport de 1 cc de solution de ClNa à 1,5/1.000,

SO_4Mn à la concentration de 3,3/1.000.000 (comme dans le tube 2 des essais SO_4Mn)

obtenue par l'apport de 1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000.



QUADRILLÉ SEMI-LOGARITHMIQUE A 3 MODULES

TOCHON - LEPAGE - PARIS

QUADRILLÉ SEMI-LOGARITHMIQUE A 3 MODULES

TOCHON - LEPAGE - PARIS

Nombre de
bactéries

15,6

S : Courbe de développement en surface

P : Courbe de développement en profondeur

9,3

5,5

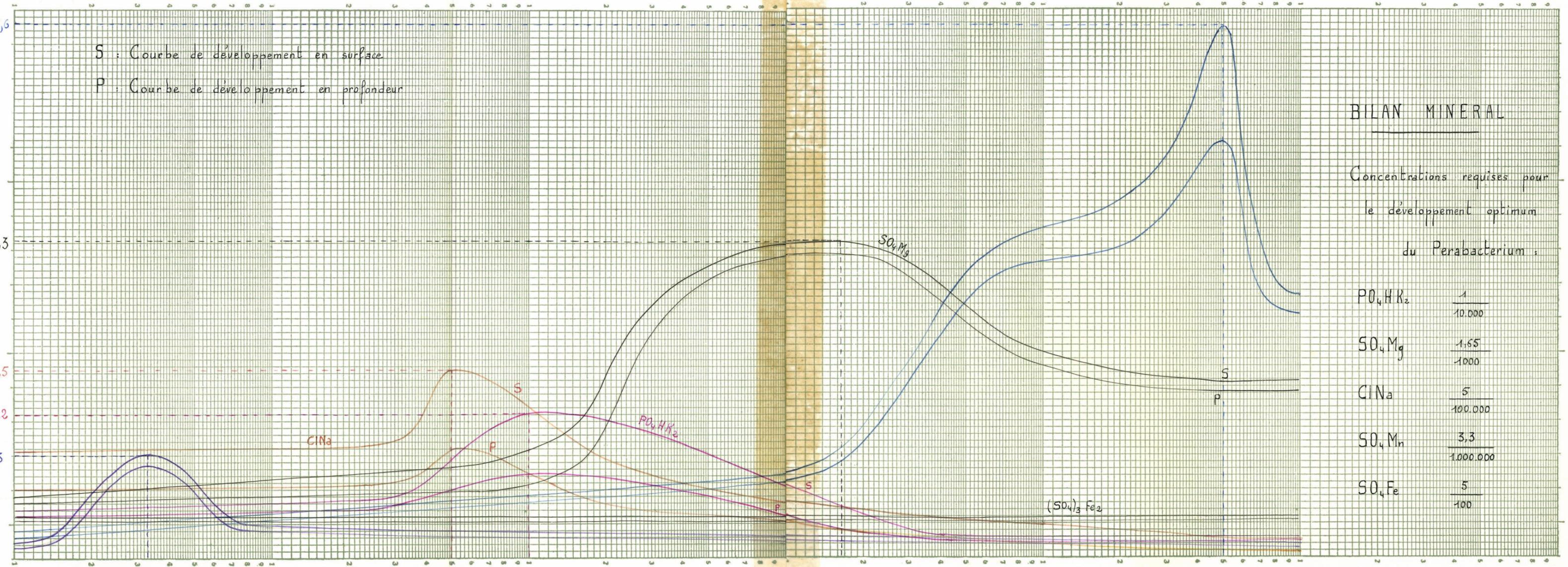
4,2

3

BILAN MINERAL

Concentrations requises pour
le développement optimum
du Perabacterium :

PO_4HK_2	$\frac{1}{10.000}$
SO_4Mg	$\frac{1,65}{1000}$
$ClNa$	$\frac{5}{100.000}$
SO_4Mn	$\frac{3,3}{1.000.000}$
SO_4Fe	$\frac{5}{100}$



$\frac{3,3}{1.000.000}$

$\frac{5}{100.000}$

$\frac{1}{10.000}$

$\frac{1,65}{1000}$

$\frac{5}{100}$

Concentrations

La concentration en SO_4Fe devait être égale à 5/100, la concentration en $(SO_4)_3Fe_2$ s'étant avérée sans importance, mais ayant à apporter les ions Fe^{+++} en quantité telle que le rapport $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$ soit égal à 39,600.

Ces conditions sont réalisées en introduisant

15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10
et 1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000.

ClK est ajouté de telle façon que :

le rapport $\frac{\text{ions } Cl^-}{\text{ions } SO_4^{--}}$ du milieu soit égal à 0,15, compris entre les valeurs favorables de 0,10 à 0,20,
et que le rapport $\frac{\text{ions } K}{\text{ions } Mg}$ ait pour valeur 3,5, ce qui nécessite l'apport de 1 cc de solution de ClK à 1/10.

Nous constatons que les substances constitutives du milieu de culture doivent être présentes à des concentrations bien déterminées et qui varient

entre 5/100 pour le sulfate ferreux

et 3,3/1.000.000 pour le sulfate de manganèse.

Nous pouvons donc distinguer :

- les substances trophiques :



qui interviennent à des concentrations relativement importantes en fournissant des éléments nécessaires aux synthèses du Perabacterium,

- et une substance oligodynamique



qui doit être présente à dose extrêmement faible et agit donc en qualité d'oligo-élément.

Nous avons ajouté les substances organiques en mêmes quantités que lors de toutes les expériences précédentes :

L'adjonction de 3 cc de bouillon de pommes de terre portait le volume total du milieu de culture à 30 cc, volume à respecter exactement pour que les différentes substances minérales introduites soient présentes dans les tubes aux concentrations indiquées précédemment.

Nous avons donc effectué l'apport de 0,03 g de peptone sous forme sèche - apport qui équivaut à l'adjonction de 3 cc d'une solution de peptone à 1 %.

Nous ajoutons le CO_3Ca nécessaire.

ENSEMENCEMENT DE CE MILIEU ET DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

Trois tubes de culture de composition indiquée ci-dessus ont été préparés,ensemencés et portés à l'étuve.

Il est apparu dans ces milieux un trouble beaucoup plus intense que celui observé lors des cultures précédentes. Ce trouble était prometteur du développement d'un nombre important d'organismes.

Les premiers prélèvements effectués ont montré que le nombre de bactéries par unité de Thoma était trop grand pour pouvoir être déterminé directement par la méthode habituelle de comptage, sans risques d'erreurs.

Aussi avons-nous procédé à des dilutions.

Les prélèvements du milieu, faits en surface et en profondeur, ont été dilués au 1/10 par adjonction d'eau.

C'est chacune de ces dilutions qui a été examinée et pour laquelle nous avons recherché le nombre de bactéries par unité de la cellule. Le nombre de bactéries par unité de Thoma existant dans le milieu était obtenu en multipliant par 10 la valeur précédemment relevée.

RESULTAT DES COMPTAGES

- Pour des prélèvements de surface

DILUTION AU 1/10 D'UN PRELEVEMENT DE SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LE PRELEVEMENT
6-4-5-4-4-5-6-	4,8	48 } 46 } 52 61 } 53 }
6-3-4-5-6-5-3-4-	4,6	
4-7-9-8-5-6-4-	6,1	
8-3-6-6-5-6-5-2-2-	5,3	
7-4-3-3-4-6-5-	4,6	46 } 43 } 47 52 }
3-4-5-6-3-5-	4,3	
4-9-5-3-5-5-6-	5,2	
4-6-6-5-6-4-	5,1	51 } 50 } 53 58 }
5-4-3-6-7-5-5-	5	
5-6-7-5-6-6-	5,8	



- Pour des prélèvements de profondeur

DILUTION AU 1/10 D'UN PRELEVEMENT DE PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LE PRELEVEMENT
5-3-4-5-6-8-6-	5,3	53 } 46 } 50 55 } 48 }
4-5-3-6-5-4-5-	4,6	
3-5-6-7-6-6-	5,5	
3-4-6-5-5-6-	4,8	
5-5-6-7-4-0-3-	4,3	43 } 49 } 46 }
3-8-7-6-7-4-5-5-4-	4,9	

RESULTAT

Nous avons établi un bilan minéral qui nous a conduite à constituer un milieu de culture où figuraient les substances minérales en concentrations et rapports correspondant aux meilleures conditions de développement du *Perabacterium*.

Les comptages effectués ont fait apparaître, sur ce milieu, un développement de :

50 bactéries par unité de Thoma pour un prélèvement de surface
48 bactéries par unité de Thoma pour un prélèvement effectué en
profondeur

Il s'avère donc considérablement amélioré par rapport à celui qui était ensemencé, au début de nos expériences et qui a constitué le tube témoin X, conduisant à un développement de :

3,6 bactéries par unité pour un prélèvement de surface
2,5 bactéries par unité pour un prélèvement de profondeur,

le coefficient d'amélioration étant de :

14 pour le développement en surface
et 19 pour le développement en profondeur.

Aussi, en raison de son intérêt, ce milieu de culture, amélioré du point de vue minéral, sera-t-il retenu et utilisé dans les expériences qui vont suivre.

Pour un volume de culture de 30 cc, il s'établit comme suit :

3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000

5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100

1 cc de solution de $ClNa$ à 1,5/1.000

1cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000

15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10

1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000

1 cc de solution de KCl à 1/10

à compléter à 30 cc par l'adjonction de substances organiques.

Nous effectuons toujours le même apport de CO_3Ca .

XIII. ACTION DE LA PEPTONE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

Nous nous proposons maintenant d'étudier l'action de substances organiques sur le développement du Perabacterium afin de déterminer à quelles concentrations il convient de les introduire dans le milieu de culture amélioré du point de vue minéral pour obtenir un milieu apte à permettre un développement optimum de la bactérie.

Nous rechercherons tout d'abord quelle action exerce la peptone sur le développement du Perabacterium.

PREPARATION DES TUBES DE CULTURE

Chaque tube est constitué par adjonction de substances organiques au milieu de culture amélioré du point de vue minéral.

La composition des tubes s'établit donc de la façon suivante :

- 3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000
- 5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100
- 1 cc de solution de $ClNa$ à 1,5/1.000
- 1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000
- 15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10
- 1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000
- 1 cc de solution de ClK à 1/10

auxquels nous ajoutons, outre le CO_3Ca , 3 cc de bouillon de pommes de terre et des quantités variables de peptone pour réaliser diverses concentrations en peptone, ainsi qu'il est indiqué ci-dessous.

	QUANTITE DE PEPTONE INTRODUITE	CONCENTRATION DU MILIEU EN PEPTONE
tube 0	nulle	nulle
tube 1	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 500 cc	$\frac{1}{1.000.000}$
tube 2	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 50 cc	$\frac{1}{100.000}$
tube 3	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 5 cc	$\frac{1}{10.000}$
tube 4	0,03 g	$\frac{1}{1.000}$
tube 5	0,3 g	$\frac{1}{100}$
tube 6	3 g	$\frac{1}{10}$
tube 7	6 g	$\frac{1}{5}$
tube 8	7,5 g	$\frac{1}{4}$
tube 9	10 g	$\frac{1}{3}$
tube 10	15 g	$\frac{1}{2}$



ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES DANS CHACUN DES TUBES

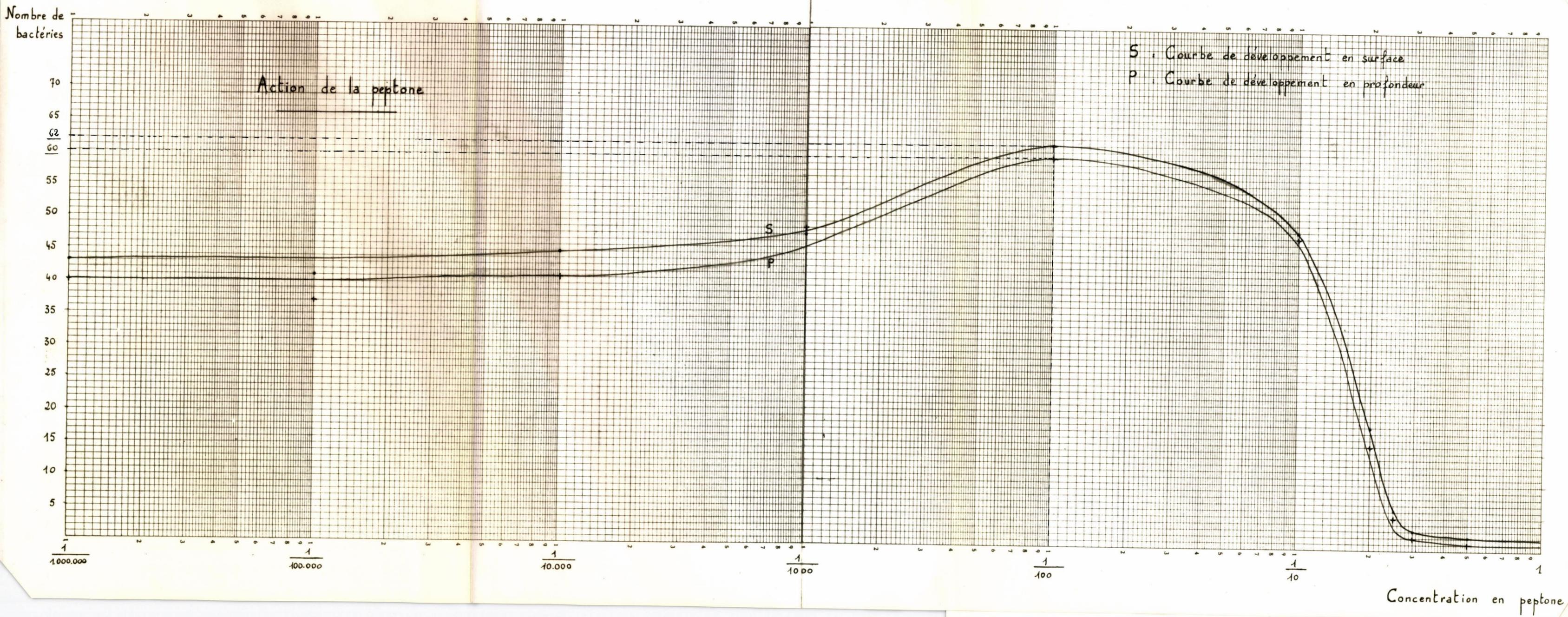
Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION DU MILIEU EN PEPTONE	PRELEVEMENT DE SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LE PRELEVEMENT INITIAL	PRELEVEMENT DE PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LE PRELEVEMENT INITIAL
tube 0	nulle	4-4-5-0-3-4-4-3- 5-4-5-3-4-2-0-2-3- 4-3-2-3-5-3-4-5-6-	3,3 3,4 4	33 34 40 } 35	3-5-4-5-3-3-4-3-2- 8-0-2-3-5-4-1-3- 3-2-3-4-3-5-1-	3,5 3,2 3	35 32 30 } 32
tube 1	$\frac{1}{1.000.000}$	4-4-3-5-2-3-8-3-4- 4-5-4-5-3-4-2-6-4- 5-4-8-3-2-6-4-5-6-	4 4,1 4,7	40 41 47 } 43	4-4-3-4-5-4-6- 5-3-6-4-5-3-5- 3-2-5-4-3-6-3-	4,2 4 3,7	42 40 37 } 40
tube 2	$\frac{1}{100.000}$	2-3-4-4-3-3-5-6-4-3- 4-3-4-5-3-2-8- 4-3-6-3-5-8-3-5-3-5-	3,7 4,1 4,5	37 41 45 } 41	4-3-4-2-5-3-3- 5-4-3-2-8-2-5-4- 5-4-3-8-2-3-6-3-2-4-	3,4 3,7 4	34 37 40 } 37
tube 3	$\frac{1}{100000}$	4-5-4-5-6-5-5-4- 6-3-3-4-6-4-7-3-5-4- 5-4-3-7-4-6-5-8-2-4-	4,3 4,4 4,8	43 44 48 } 45	2-3-4-6-4-3-2-7-4-3- 2-4-7-5-4-6-3-4-5-3-	3,9 4,3	39 43 } 41
tube 4	$\frac{1}{1.000}$	4-4-4-3-4-3-5-6-5-4- 4-6-5-3-7-5-4-6-5-7- 4-6-5-7-4-3-4-5-	4,4 5,2 4,7	44 52 47 } 48	5-4-5-3-5-6-4-3-7-5- 5-4-6-3-7-4-5-6-5-6-	4,7 5,1	47 51 } 49
tube 5	$\frac{1}{100}$	5-6-7-6-8-9-7-8-3-4-5- 6-7-8-6-7-7-6-6-5- 6-9-7-8-8-5-6-5-6- 4-6-4-9-6-5-4-7-8-5- 5-9-7-6-5-6-3-8-7-6-	6,1 6,4 6,6 5,9 6,2	61 64 66 59 62 } 64 61 } 62	6-5-7-5-6-5-8-7-6- 6-7-8-5-6-8-4-5- 6-8-7-5-6-7-6-7-	6,1 5,5 6,5	61 55 65 } 60
tube 6	$\frac{1}{10}$	8-5-5-4-3-6-5- 4-5-6-8-4-5-4-3-5-4-	5,1 4,8	51 48 } 49	4-5-2-4-6-7-5-4-8-3-	4,8	48
tube 7	$\frac{1}{5}$	<u>Comptage sans dilution</u> 12-14-16-21-22-18-23- 19-20-22-16-18-22-19-24-	18 20	19	<u>Comptage sans dilution</u> 16-15-13-19-20-16-13-22-18- 16-18-	16	
tube 8	$\frac{1}{4}$	2-6-3-2-8-4-6-4- 2-3-6-6-8-12-5-	4,3 6	5	2-3-7-6-6-8-4-	5	
tube 9	$\frac{1}{3}$	1-3-2-4-2-3-1-4- 2-6-3-1-4-2-3-3-3-	2,5 3	2,7	2-0-2-0-1-3-2-4-5-0-	1,9	
tube 10	$\frac{1}{10}$	1-3-2-1-4-2- 1-3-4-2-6-0-2-		2 2	1-0-2-1-1-1-2-1-	1	
tube X témoin		<u>Sans dilution</u> 2-4-3-0-5-4-2-3-5-6-		3,4	<u>Sans dilution</u> 1-3-2-0-4-3-2-5-4-3-	2,7	

COURBE

Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma, en fonction de la concentration du milieu de culture en peptone.

J
E



RESULTATS

L'étude des diverses valeurs obtenues montre que la présence de peptone dans le milieu de culture, à des concentrations inférieures à 1/10, est favorable au développement du Perabacterium.

En effet, pour le tube 0, dépourvu de peptone, nous décelons :

35 bactéries par unité pour un prélèvement de surface

et 32 bactéries par unité pour un prélèvement effectué en profondeur tandis que le tube 1, où la concentration en peptone est égale à 1/1.000.000 permet l'installation de :

43 bactéries par unité en surface

et 40 bactéries par unité en profondeur.

La peptone étant introduite en quantité plus importante, le milieu de culture s'améliore et le nombre d'organismes s'accroît. Nous obtenons :

62 bactéries par unité pour un prélèvement de surface

et 60 bactéries par unité pour un prélèvement de profondeur

pour une concentration en peptone de 1/100 au-delà de laquelle le nombre de bactéries des cultures diminue, des concentrations supérieures à 1/4 exerçant une action nettement inhibitrice sur la croissance.

Pour chercher à atteindre les conditions les plus favorables de développement du Perabacterium, il conviendra donc de constituer un milieu de culture où la peptone figure à la concentration de 1/100.

XIV. ACTION DU GLUCOSE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

Après avoir étudié l'action d'une substance peptidique sur le développement du Perabacterium, nous nous proposons de rechercher l'influence exercée sur ce développement par un glucide, le glucose.

Les tubes de culture seront dépourvus de peptone et constitués par adjonction de quantités variables de glucose au milieu amélioré du point de vue minéral. L'apport de bouillon de pommes de terre sera effectué comme lors de toutes les séries de culture précédentes.

PREPARATION DES TUBES DE CULTURE

Les tubes sont constitués de la façon suivante :

3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000

5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100

1 cc de solution de $ClNa$ à 1,5/1.000

1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000

15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10

1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000

1 cc de solution de ClK à 1/10

3 cc de bouillon de pommes de terre

auxquels nous ajoutons le CO_3Ca et des quantités variables de glucose, pour réaliser diverses concentrations ainsi qu'il est indiqué dans le tableau suivant :

	QUANTITE DE GLUCOSE INTRODUITE	CONCENTRATION DU MILIEU EN GLUCOSE
tube 1	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 500 cc	$\frac{1}{1.000.000}$
tube 2	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 50 cc	$\frac{1}{100.000}$
tube 3	$\frac{1}{2}$ cc d'une solution à 0,03 g pour 5 cc	$\frac{1}{10.000}$
tube 4	0,03 g	$\frac{1}{1.000}$
tube 5	0,3 g	$\frac{1}{100}$
tube 6	3 g	$\frac{1}{10}$
tube 7	6 g	$\frac{1}{5}$
tube 8	7,5 g	$\frac{1}{4}$
tube 9	10 g	$\frac{1}{3}$
tube 10	15 g	$\frac{1}{2}$

ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN GLUCOSE	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE	PRELEVEMENT EFFECTUE EN PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE DE THOMA	MOYENNE
tube 1	$\frac{1}{1.000.000}$	4-5-0-3-4-5-4-6-6-5-4- 0-4-5-3-7-4-3-4-0-5-4-	4,3 } 3,5 } 3,9	5-3-4-2-6-4-3-4-3- 4-3-0-3-5-4-3-2-3-4-	3,6 } 3,1 } 3,3
tube 2	$\frac{1}{100.000}$	7-6-4-5-5-9-4-8-7-12- 5-4-6-5-4-9-8-5-6-6-	6,7 } 5,8 } 6,2	12-4-3-7-8-3-7-6-5-5- 4-6-7-5-2-6-5-8-5-6-	6 } 5,4 } 5,7
tube 3	$\frac{1}{10.000}$	15-12-14-16-10-17-8-10-15- 20-12-13-8-9-20-14-18-16-16-19-	13 } 15 } 14	12-14-10-16-20-9-26-14-13- 10-14-12- 18-8-17-13-16-17-	14,8 } 14 } 14,4
tube 4	$\frac{1}{1.000}$	18-16-24-20-23-9-22-28- 14-20-21-16-18-15-22-27-17-	20 } 22 } 21	12-14-21-22-16-18-17-24- 24-18-26-22-28-14-17-20-21-20-	18 } 21 } 19
tube 5	$\frac{1}{100}$	28-16-22-29-25-22-26-	24	24-25-15-28-21-27-21- 19-25-24-23-15-19-8-27-	23 } 20 } 22
tube 6	$\frac{1}{10}$	9-10-12-8-7-9-8-9-9- 10-9-10-8-17-13-11-10-11	9 } 11 } 10	12-14-8-7-10-11-12-8- 11-8-9-10-11-12-14-10-10-	10 } 10 } 10
tube 7	$\frac{1}{5}$	5-7-10-9-12-8-7-8- 4-6-10-5-7-8-9-12-	8,2 } 7,6 } 7,9	4-5-7-8-9-5-4-6- 5-7-8-12-7-8-7-8-10-	6 } 8 } 7
tube 8	$\frac{1}{4}$	4-5-3-7-7-5-4-5- 5-4-3-7-8-6-5-6-8-	5 } 5,8 } 5,4	4-3-7-4-3-4-5-5- 4-6-7-3-5-4-6-5-4-8-	5 } 5,2 } 5,1
tube 9	$\frac{1}{3}$	5-4-4-5-4-3-4-3-5- 4-5-8-3-7-2-4-5-	4,1 } 4,5 } 4,3	5-2-5-9-1-2-5-9-2-3-5-4-3- 7-12-5-9-3-7-7-3-3-	4,2 } 4,3 } 4,25
tube 10	$\frac{1}{2}$	5-2-3-5-4-3-0-1-2-5-	3	4-5-0-3-2-3-3-4-4-3-	3,1
tube X témoin		3-2-3-4-5-0-3-4-7-7-	3,8	2-3-5-4-3-2-3-4-0-3-	2,9

COURBE

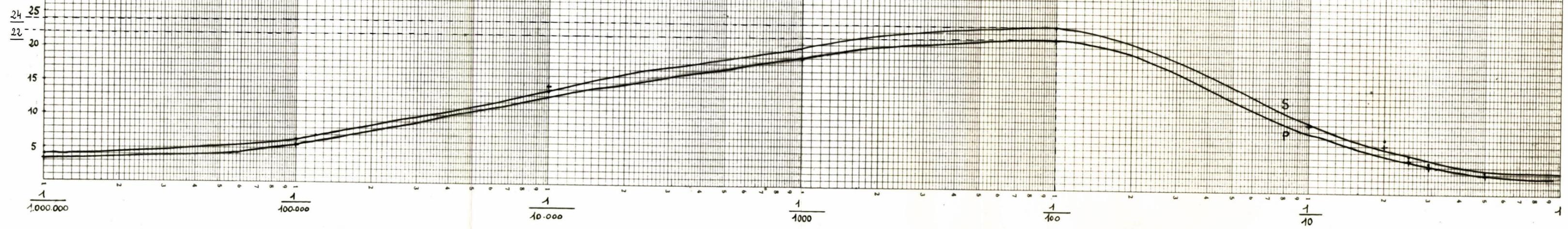
Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma, en fonction de la concentration du milieu en glucose.



S : Courbe de développement en surface
P : Courbe de développement en profondeur

Action du glucose

Nombre de bactéries



Concentration en glucose

RESULTATS

L'étude des valeurs déterminées et l'examen des courbes tracées montre que le glucose exerce une action inhibitrice sur le développement du Perabacterium.

En effet, sur les milieuxensemencés au cours de cette série d'essais, le nombre de bactéries par unité de Thoma reste toujours compris entre 3 et 24. Or, un milieu ne renfermant que substances minérales et bouillon de pommes de terre, permet d'obtenir environ 35 bactéries par unité.

Les développements s'étaient révélés beaucoup plus importants lorsque l'apport de substances organiques s'effectuait sous forme de peptone.

Il n'apparaît donc pas judicieux de faire figurer le glucose dans la composition d'un milieu de culture devant répondre aux exigences du Perabacterium.

XV. ACTION DU BOUILLON DE POMMES DE TERRE
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

Recherche de l'influence de la concentration d'un bouillon de pommes de terre sur le développement du Perabacterium.

PREPARATION DES TUBES DE CULTURE

Dans chaque tube sont portés :

3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000

5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100

1 cc de solution de $ClNa$ à 1,5/1.000

1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000

15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10

1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000

1 cc de solution de ClK à 1/10

1e CO_3Ca

constituant le milieu amélioré du point de vue minéral auquel nous ajoutons 0,3 g de peptone, qui s'est montré constituer l'apport organique le plus favorable.

Les milieux seront complétés à 30 cc par l'adjonction de 3 cc d'un bouillon de pommes de terre plus ou moins riche en éléments dissous ou en fines particules en suspension.

Le bouillon de pommes de terre sera considéré introduit à une concentration égale à l'unité s'il s'agit de 3 cc d'un filtrat obtenu en amenant à 500 cc le bouillon de 500 g de pommes de terre, ou si ce même rapport entre :

valeur du volume du filtrat

et valeur du poids de pommes de terre

est égal à 1.

A partir de ce filtrat, nous réaliserons, par dilutions, des concentrations inférieures à 1, tandis que des concentrations supérieures à l'unité résulteront d'un apport de 3 cc d'un filtrat plus riche en extraits de pommes de terre.

OBTENTION DES DIVERSES CONCENTRATIONS

	APPORT DE BOUILLON DE POMMES DE TERRE	CONCENTRATION EN BOUILLON DE POMMES DE TERRE
tube 0	pas de bouillon de pommes de terre	nulle
tube 4	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{1.000}$	$\frac{1}{1.000}$
tube 5	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$
tube 6	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$
tube 7	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$
tube 8	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
tube 9	3 cc d'un bouillon unitaire dilué au $\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
tube 10	3 cc d'un bouillon unitaire dilué à $\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
tube 11	3 cc de bouillon unitaire	1
tube 3	3 cc d'un bouillon à 650 g de pommes de terre pour 500 cc de filtrat	$\frac{4}{3} = 1,3$
tube 2	3 cc d'un bouillon à 800 g de pommes de terre pour 500 cc de filtrat	$\frac{5}{3} = 1,6$
tube 1	3 cc d'un bouillon à 1.000 g de pommes de terre pour 500 cc de filtrat	2



ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES ORGANISMES

Résultats des comptages effectués.

	CONCENTRATION EN BOUILLON de POMMES DE TERRE	PRELEVEMENT DE SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LE PRELEVEMENT INITIAL	PRELEVEMENT DE PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LE PRELEVEMENT INITIAL
tube 0	nulle	0-2-1-3-0-2-1-1-1- 0-4-2-1-2-3-0-1-3-1-	1,2 1,7	12 } 15 17	0-1-3-2-2-1-2-1-1-2- 1-4-0-3-2-0-0-2-1-0-	1,5 1,3	15 } 14 13
tube 4	$\frac{1}{1.000}$	2-2-3-0-4-2-2-3-3-2- 0-2-1-3-4-2-1-4-5-6-	2,3 2,8	23 } 25 28	4-3-0-2-3-2-3-3-4-3- 3-2-4-5-0-1-0-1-	2,7 2	27 } 23 20
tube 5	$\frac{1}{100}$	4-0-2-3-2-4-0-3-2-4- 0-1-4-2-3-2-1-1-4-3-	2,5 2,1	25 } 23 21	4-2-0-1-3-2-1-3-4-4- 3-1-0-4-1-1-2-3-1-3-	2,4 1,9	24 } 22 19
tube 6	$\frac{1}{10}$	4-1-3-2-6-4-2-1-3-4- 5-2-0-3-4-2-1-4-2-8-	3 3,1	30 31	4-2-3-5-0-3-2-4-3-	2,8	28
tube 7	$\frac{1}{5} = 0,20$	3-5-4-2-4-5-3-5-4-4- 4-7-3-2-6-3-4-2-6-6-	3,9 4,3	39 } 41 43	6-3-2-5-4-6-2-3-4-5- 4-5-0-3-7-3-1-1-3-7-	4 3,4	40 } 37 34
tube 8	$\frac{1}{4} = 0,25$	5-4-2-3-2-6-4-4-6-10- 4-7-2-4-3-12-5-4-7-	4,6 4,8	46 } 47 48	5-0-2-3-4-7-9-11-3- 4-7-2-1-0-3-11-2-11-	4,4 4,1	44 } 43 41
tube 9	$\frac{1}{3} = 0,33$	4-2-6-5-7-3-8-5-6-5- 4-7-5-3-4-2-3-6-8-	5,1 5,3	51 } 52 53	6-3-7-4-2-6-2-3-4-11-	4,8	48
tube 10	$\frac{1}{10} = 0,50$	5-4-10-4-3-5-3-4-6-10-	5,4	54	7-7-3-4-3-2-4-5-6-10-	5,1	51
tube 11	1	6-4-5-0-8-10-5-6-12-3- 6-10-7-5-4-8-0-4-6-11-	5,9 6,1	59 } 60 61	5-7-4-10-5-3-7-4-5-8-	5,8	58
tube 3	$\frac{4}{3} = 1,3$	5-3-4-6-7-11-7-10-6-5- 4-5-7-5-10-12-5-8-4-1-	6,4 6,1	64 } 63 61	4-5-6-8-7-10-8-5-4-6-	6,3	63
tube 2	$\frac{5}{3} = 1,6$	6-6-8-6-8-4-5-7-8-9-	6,7	67	4-6-7-0-5-8-5-10-11-8-	6,4	64
tube 1	2	4-3-1-2-6-4-5-3-8-4- 3-4-2-1-5-3-4-3-5-6-	4 3,6	40 } 38 36	0-5-4-6-3-0-4-5-4-3-	3,4	34
tube X témoin		<u>Sans dilution</u> 3-4-0-5-4-4-3-4-3-5-	3,5		<u>Sans dilution</u> 2-3-1-0-4-2-3-3-6-4-	2,8	

COURBE

Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de la cellule de Thoma, en fonction de la concentration du milieu en bouillon de pommes de terre.



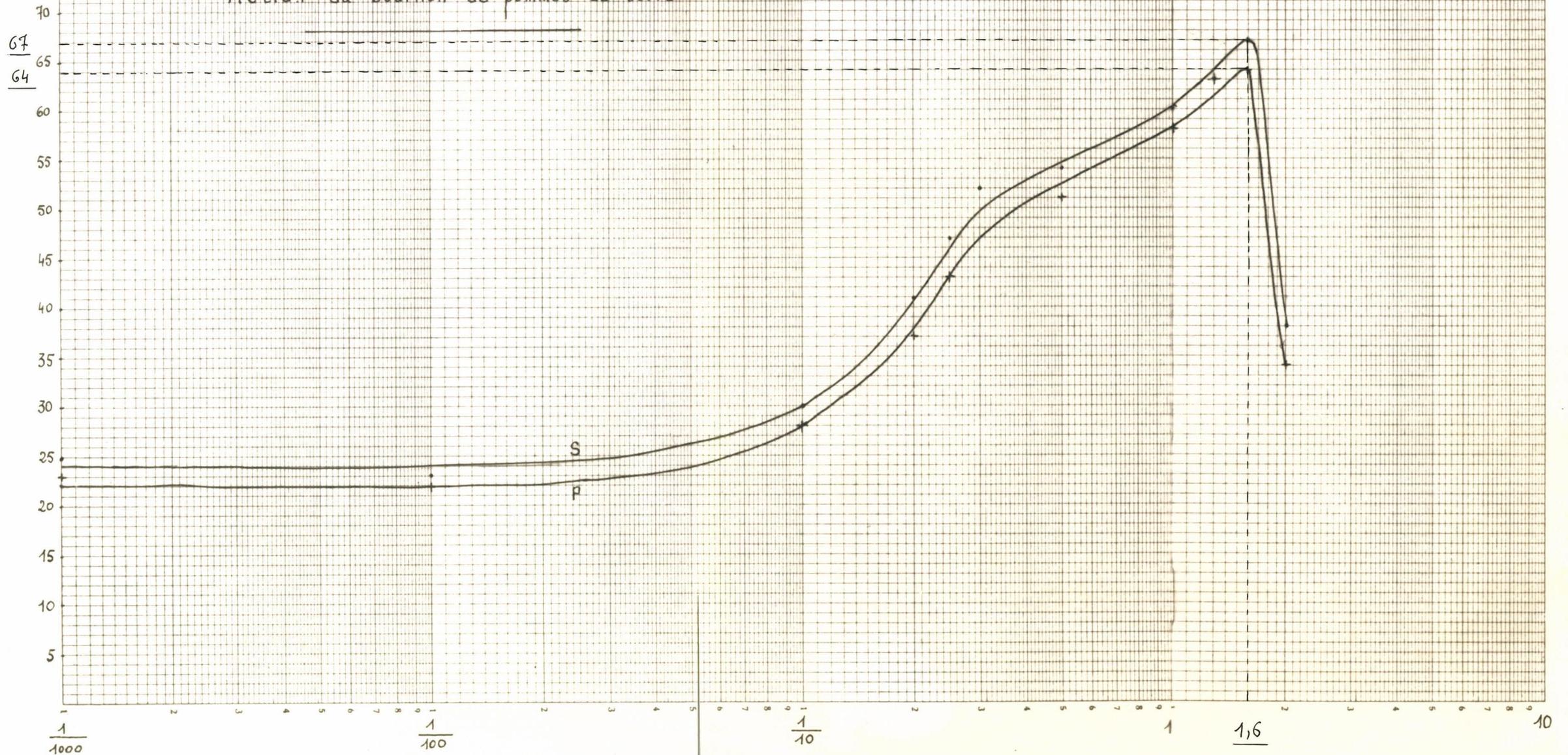


Nombre de bactéries

Action du bouillon de pommes de terre

S : Courbe de développement en surface

P : Courbe de développement en profondeur



Concentration en bouillon de pommes de terre

RESULTATS

Nous constatons que l'apport de bouillons de pommes de terre, de plus en plus concentrés, améliore le développement du *Perabacterium* qui atteint la valeur de :

67 bactéries par unité de la cellule de Thoma

pour un prélèvement de surface

et 64 bactéries par unité, pour un prélèvement de profondeur

lorsque la concentration est égale à 1,6.

Cette concentration est réalisée en introduisant dans le milieu de culture 3 cc d'un filtrat préparé à partir de 800 g de pommes de terre et amené à 500 cc.

Mais l'apport ne doit pas excéder cette valeur ainsi qu'en témoigne le tube 1 où le bouillon de pommes de terre, présent à une concentration égale à 2, provoque une diminution importante du nombre de bactéries établies dans le milieu.

Les glucides s'étant montrés, au cours d'une série d'essais précédents, ne pas favoriser le développement du *Perabacterium*, nous attribuons l'action favorable exercée, jusqu'à concentration de 1,6, par le bouillon de pommes de terre, aux substances oligodynamiques qu'il est susceptible de renfermer. La diminution du nombre d'organismes, observée pour le tube 1, s'expliquerait par le rôle inhibiteur que pourraient jouer ces substances lorsqu'elles sont apportées en trop grandes quantités.

XVI. ACTION DE LA DUREE DE SEJOUR DES MILIEUX ENSEMENCES, A L'ETUVE,
SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM

Les tubes de culture, après ensemencement, sont portés à l'étuve où ils sont maintenus à une température stabilisée à 23°C, température favorable au développement des microorganismes. Au cours de toutes les expériences précédentes, ils y ont séjourné 10 jours, durée au bout de laquelle nous avons effectué les numérations de bactéries installées sur les différents milieux.

Ce temps de séjour à l'étuve permettait-il l'obtention du plus grand nombre de bactéries ?

Afin de déterminer la période nécessaire au peuplement optimum du milieu par le Perabacterium, nous avons préparé des tubes de culture identiques, qui ont été étudiés après avoir subi des durées croissantes de présence à l'étuve.

PREPARATION DES TUBES DE CULTURE

Dans chaque tube sont portées les substances minérales et organiques en quantités telles que les meilleures conditions de développement soient offertes au Perabacterium.

A savoir :

3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000

5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100

1 cc de solution de ClNa à 1,5/1.000

1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000

15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10

1 cc de solution de $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$ à 0,5/10.000

1 cc de solution de ClK à 1/10

0,3 g de peptone

3 cc de bouillon de pommes de terre obtenu en amenant à 500 cc le bouillon
de 800 g de pommes de terre.

Nous effectuons l'apport de CO_3Ca .

RESULTAT DES COMPTAGES EFFECTUES AU BOUT DE DUREES CROISSANTES DE SEJOUR A L'ETUVE

Détermination du nombre d'organismes de chacun des milieux.

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE	PRELEVEMENT EN SURFACE NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES POUR LE PRELEVEMENT INITIAL	PRELEVEMENT DE PROFONDEUR NOMBRE DE BACTERIES PAR UNITE POUR UN MILIEU DILUE AU 1/10	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LA DILUTION	NOMBRE MOYEN DE BACTERIES PAR UNITE POUR LE PRELEVEMENT INITIAL
7 jours	3-2-4-2-3-3-4- 4-2-3-5-2-3-4-5- 2-3-5-1-6-4-3-	3 3,5 3,6	30 35 36 } 33	2-4-3-0-2-3-4-5-2-3- 4-2-3-1-5-2-4-5-2-2- 1-2-4-3-0-1-2-5-6-3-	2,8 3 2,7	28 30 27 } 28
8 jours	3-2-5-4-5-4-3-6-7-7- 6-3-2-3-5-3-4-3-8-5- 5-7-7-5-3-2-2-4-10-5-	4,6 4,2 5	46 42 50 } 46	2-3-3-4-9-3-5-3-6-8- 4-3-2-4-3-3-6-5-4-5- 4-3-2-0-6-7-4-5-7-	4,6 3,9 3,8	46 39 38 } 41
9 jours	4-6-5-8-3-5-7-4-10-6- 5-0-10-7-11-3-4-3-7-10-	5,8 6	58 60 } 59	5-4-6-3-10-7-5-5-6-6- 4-3-1-10-9-4-6-5-8-5-	5,7 5,5	57 55 } 56
10 jours	4-7-6-8-5-10-6-7-6-6- 5-7-4-8-10-5-7-8-6-7-	6,5 6,7	65 67 } 66	7-4-7-5-6-8-7-7-3-8- 5-7-8-4-6-5-9-5-9-6-	6,2 6,4	62 64 } 63
11 jours	4-6-5-8-9-11-6-5-9-7- 6-4-10-7-12-5-4-5-11-8-	7 7,2	70 72 } 71	5-4-8-6-7-6-5-6-8-12-	6,7	67
13 jours	4-5-3-2-6-5-5-6-7-5- 5-3-4-0-6-3-5-4-8-8-	4,8 4,6	48 46 } 47	6-4-3-5-3-6-2-8-2-3- 4-5-3-0-7-4-3-5-4-	4,3 3,9	43 39 } 41
14 jours	5-4-5-6-2-4-5-4-	4,3	43	5-6-4-2-3-7-5-3-4-3-2-	4	40
15 jours	4-5-8-3-7-4-6-5-0-3- 2-4-3-6-2-4-3-3-8-	4,5 3,9	45 39 } 42	6-4-5-3-7-4-5-2-0-3-	3,9	39
18 jours	7-5-2-4-3-0-2-4-3-6-5-	3,7	37	3-2-4-6-5-4-2-2-	3,5	35
19 jours	2-4-3-5-7-2-3-4-0-4- 5-4-3-2-5-4-4-6-5-2-0-4-	3,4 3,6	34 36 } 35	2-4-3-0-5-3-4-4-2-3- 4-3-5-2-3-2-4-3-0-6-	3 3,2	30 32 } 31

COURBE

Représentation graphique du nombre moyen de bactéries par unité de Thoma,
en fonction de la durée de séjour à l'étuve des tubes de culture.

RTT

Action de la durée de séjour à l'étuve

S : Courbe de développement en surface

P : Courbe de développement en profondeur

Nombre de bactéries

$\frac{71}{67}$

70

67

60

50

40

30

20

10

0

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

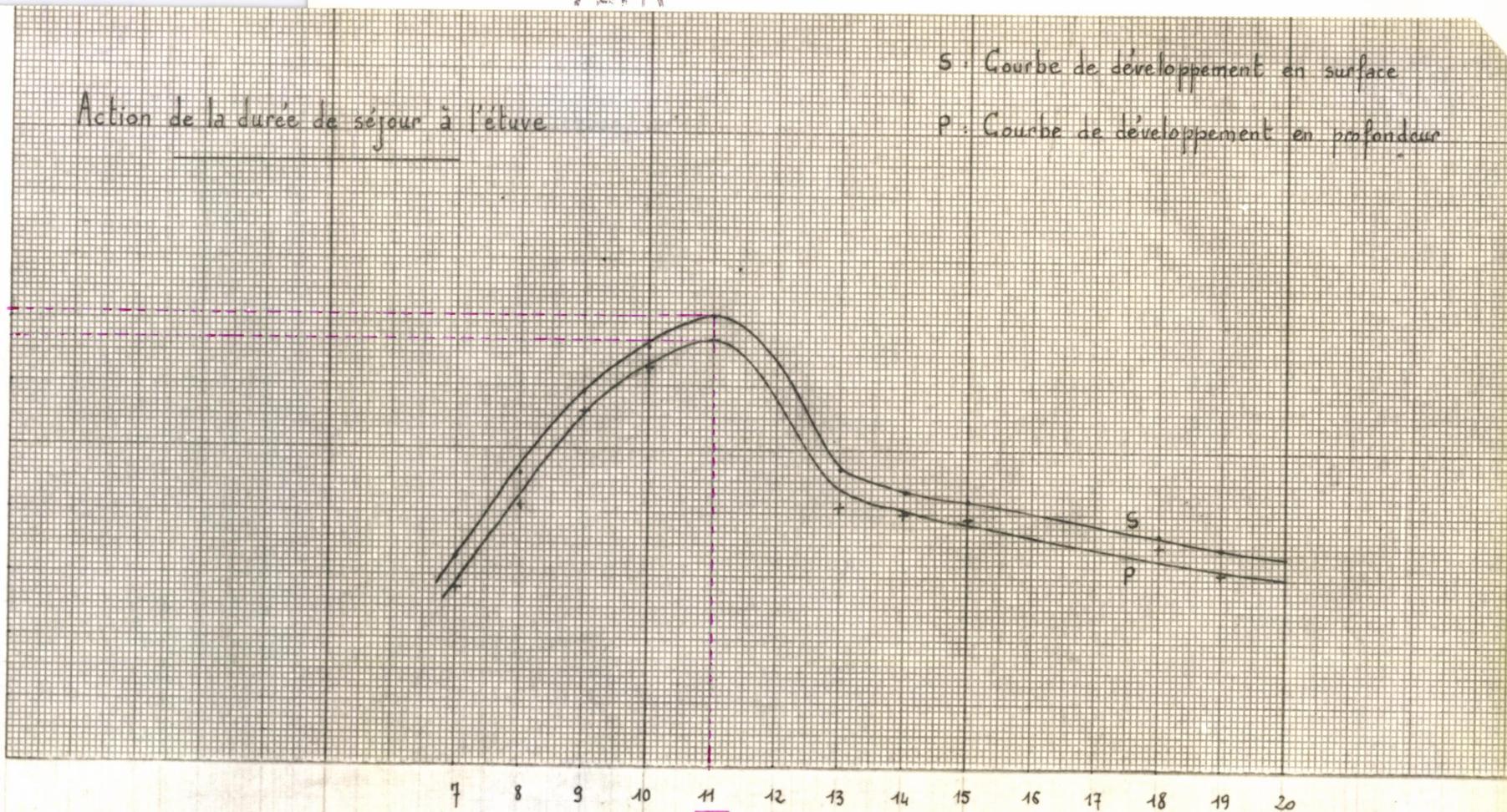
17

18

19

20

Nombre de jours d'étuve



RESULTATS

Nous avons constaté que l'aspect des tubes commence à se modifier après qu'ils aient séjourné 4 ou 5 jours à l'étuve : un léger trouble est, en effet, perceptible. Il apparaît nettement au bout d'environ 7 jours et s'accroît : devenant plus important au bout de 8 jours, intense au 9^e jour et très dense vers les 10 et 11^e jours. Mais, à partir du 13^e jour environ, une coloration rouille devient visible dans tout le contenu des tubes. Elle est suffisamment soutenue au bout du 15^e jour, pour masquer le trouble existant. Elle augmente tandis que les milieux s'épaississent et prennent la consistance d'un sirop. Vers le 20^e jour, une précipitation se produit au fond du tube.

Le trouble est attribué au développement du *Perabacterium* : les organismes deviennent de plus en plus nombreux. Nous avons décelé :

33 bactéries par unité après un temps de séjour à l'étuve de 7 jours
et 71 bactéries par unité après une durée de séjour de 11 jours.

Le *Perabacterium* effectuant ses synthèses rejette de l'hydroxyde ferrique résiduel, qui apparaît en grande quantité lorsque le milieu est peuplé au maximum, et confère bientôt sa teinte aux cultures.

A partir du 12^e jour d'étuvage, nous déterminons des nombres de bactéries décroissants, tandis que le milieu s'épuise, le sel ferreux se transformant en sel ferrique.

Au-delà du 20^e jour, nous ne pouvons plus effectuer de comptages dont les résultats puissent être comparés aux précédents : en effet, des phénomènes de précipitation se sont produits dans les milieux de culture.

- Un précipité, très dense, roux brunâtre, est apparu au fond des tubes. Il provient de la destruction des milieux. Les substances précipitées ont entraîné avec elles un grand nombre de bactéries qui se maintiendront probablement sur ce substrat dans la mesure où elles y trouveront les éléments nécessaires à leurs synthèses, puis sporuleront.

- La partie supérieure des tubes renferme une solution presque limpide où l'on ne décèle plus que quelques organismes. En raison de ces précipitations, les numérations d'organismes n'étaient plus significatives.

La durée de séjour à l'étuve convenant à l'obtention d'un milieu en sa plus grande richesse en Perabacterium s'est donc montrée être de 11 jours.

XVII. CONCLUSION - ETABLISSEMENT DU BILAN GENERAL

Nous avons déterminé, dans une première partie de ce travail, à quelles concentrations il convenait de faire figurer, dans les milieux de culture, les diverses substances minérales constitutives de la solution saline de Winogradsky, pour permettre le développement maximum du *Perobacterium spelei*. Puis, nous avons recherché quels équilibres ioniques étaient requis pour l'obtention d'un milieu favorable à la culture de cette bactérie.

Les résultats nous ont permis de conclure que :

1e $PO_4 HK_2$	devait exister dans le milieu à la concentration de 1/10.000
1e $SO_4 Mg$ 1,65/1.000
1e $Cl Na$ 0,5/10.000
1e $SO_4 Mn$ 3,3/1.000.000
1e $SO_4 Fe$ 5/100

et que les équilibres ioniques :

$$\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}} = 39.600$$

$$\frac{K}{Mg} = 3,5$$

$$\frac{Cl^-}{SO_4} = 0,15$$

devaient être maintenus.

Ce bilan minéral étant établi, nous avons constitué un milieu de culture amélioré du point de vue minéral et dont la composition était la suivante :

- 3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000
créant dans le milieu une concentration de 1/10.000 en PO_4HK_2
- 5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100
créant dans le milieu une concentration de 1,65/1.000 en SO_4Mg
- 1 cc de solution de $ClNa$ à 1,5/1.000
créant dans le milieu une concentration de 0,5/10.000 en $ClNa$
- 1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000
créant dans le milieu une concentration de 3,3/1.000.000 en SO_4Mn
- 15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10
créant dans le milieu une concentration de 5/100 en SO_4Fe
- 1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000
qui permet l'établissement d'un rapport $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$ égal à 39.600
- 1 cc de solution de ClK à 1/10
qui réalise les rapports ioniques $\frac{Cl^-}{SO_4} = 0,15$ et $\frac{K}{Mg} = 3,5$.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'influence exercée par les substances organiques sur le développement du *Perabacterium*.

Il est apparu qu'il convenait d'effectuer les apports organiques sous forme de :
0,3 g de peptone par tube, créant une concentration en peptone de 1/100
et 3 cc d'un bouillon de pommes de terre préparé à partir de 800 g de pommes de terre et amené à 500 cc.

Enfin, l'étude de l'influence de la durée d'incubation des milieux a conduit à conclure que la plus forte densité de peuplement du substrat était obtenue pour un milieu ayant subi 11 jours de présence à l'étuve.

La composition du milieu type répondant aux exigences du *Perabacterium spelei* s'établit donc comme suit :

- 3 cc de solution de PO_4HK_2 à 1/1.000
- 5 cc de solution de SO_4Mg à 1/100

- 1 cc de solution de ClNa à 1,5/1.000
- 1 cc de solution de SO_4Mn à 1/10.000
- 15 cc de solution de SO_4Fe à 1/10
- 1 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 0,5/10.000
- 1 cc de solution de KCl à 1/10
- 0,3 g de peptone
- 3 cc du bouillon de pommes de terre défini précédemment

pour un volume total de 30 cc.

On effectue toujours le même apport de CO_3Ca .

Possibilité de préparation de 1.000 cc de milieu minéral type :

Les substances organiques doivent être ajoutées dans les tubes au moment de leur mise en culture, car leur introduction dans une solution bilan type constituée à l'avance et apte à être utilisée lors de la préparation de milieux à ensemercer, ne peut être réalisée en raison de l'oxydation rapide que subissent les composants du bouillon de pommes de terre.

Mais nous pouvons composer un milieu minéral type qui se maintient sans s'altérer.

Pour un volume de 1.000 cc, il s'établit de la façon suivante :

PO_4HK_2	0,11 g
SO_4Mg	1,85 g
ClNa	0,05 g
SO_4Mn	0,0037 g
SO_4Fe	55,5 g
$(SO_4)_3Fe_2$	0,0018 g
KCl	3,70 g
eau	1.000 cc

Les poids de SO_4Mn et $(SO_4)_3Fe_2$ à introduire étant très faibles et donc difficiles à obtenir exactement, il est préférable d'effectuer l'apport de ces substances sous forme de :

3,7 cc de solution de SO_4Mn à 1/1.000

et 1,8 cc de solution de $(SO_4)_3Fe_2$ à 1/1.000

le volume d'eau à ajouter étant alors égal à 994,5 cc.

Chaque tube de culture sera constitué, au moment de l'emploi, dans les proportions de :

27 cc de cette solution minérale type
pour 3 cc du bouillon de pommes de terre défini précédemment
et 0,3 g de peptone.

Amélioration de nos cultures :

Le milieu de culture établi pour nos premiers essais conduisait à un développement de :

3,6 bactéries par unité de Thoma pour un prélèvement de surface
et 2,5 bactéries par unité pour un prélèvement effectué en profondeur.

L'amélioration du milieu et des conditions de culture a permis d'obtenir un développement de :

71 bactéries par unité pour un prélèvement de surface
et 67 bactéries par unité pour un prélèvement de profondeur.

Le coefficient d'amélioration est donc voisin de 20 pour le développement de surface et atteint 26 pour le développement de profondeur.

Chaque unité de la cellule de Thoma ayant un volume de $1/4.000 \text{ mm}^3$, en considérant que les 15 cc de la partie supérieure du tube présentent la densité de peuplement déterminée lors du prélèvement en surface et que les 15 cc de la partie inférieure du tube présentent la densité décelée lors du prélèvement de profondeur, il nous est possible de déterminer le nombre de bactéries pour la totalité du milieu de cultureensemencé, soit pour 30 cc.

Lors du premier essai de culture, nous obtenions :

$14,4 \cdot 10^6$ bactéries par centimètre cube dans la partie supérieure du tube
et $10 \cdot 10^6$ bactéries par centimètre cube dans la partie inférieure du tube,
soit, pour la totalité du tube de culture : $366 \cdot 10^6$ bactéries.

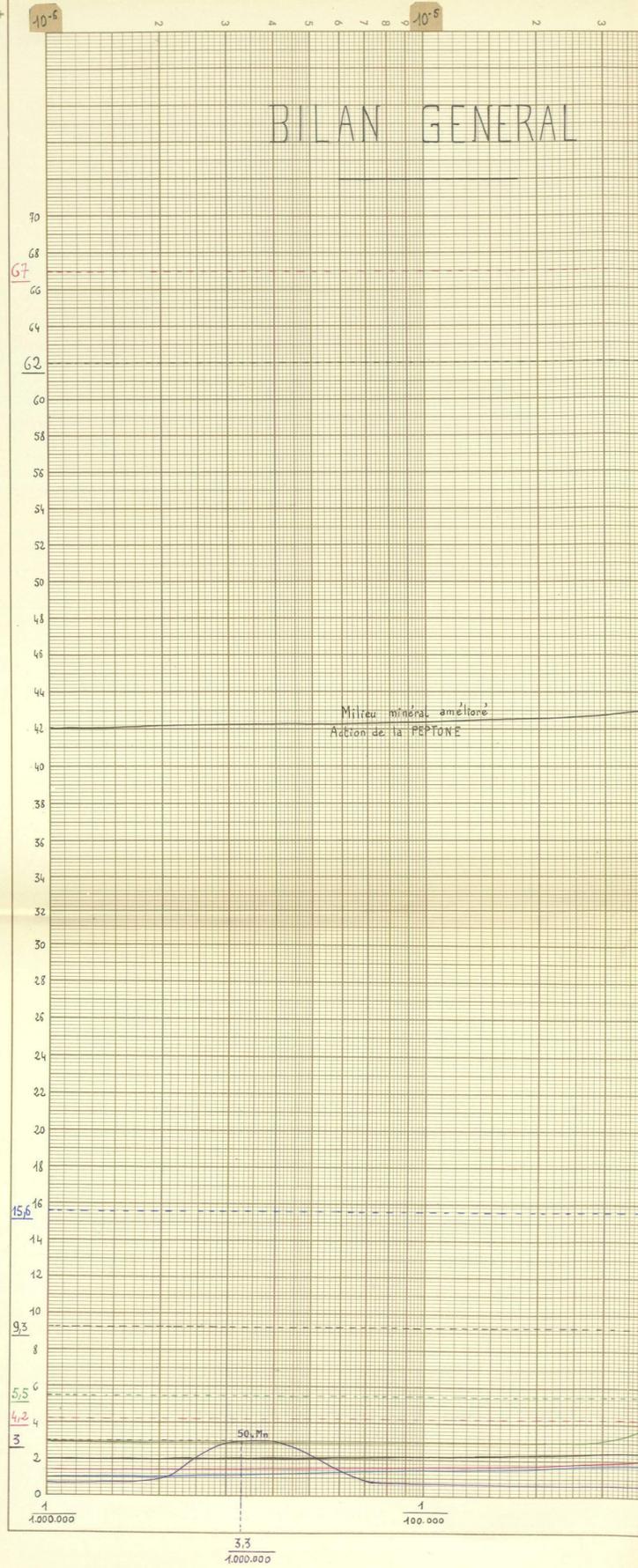
Dans un tube de culture fournissant les conditions optimales de développement du Perabacterium, le nombre d'organismes est évalué à :

$284 \cdot 10^6$ par centimètre cube dans la partie supérieure du tube
et $268 \cdot 10^6$ par centimètre cube dans la partie inférieure du tube

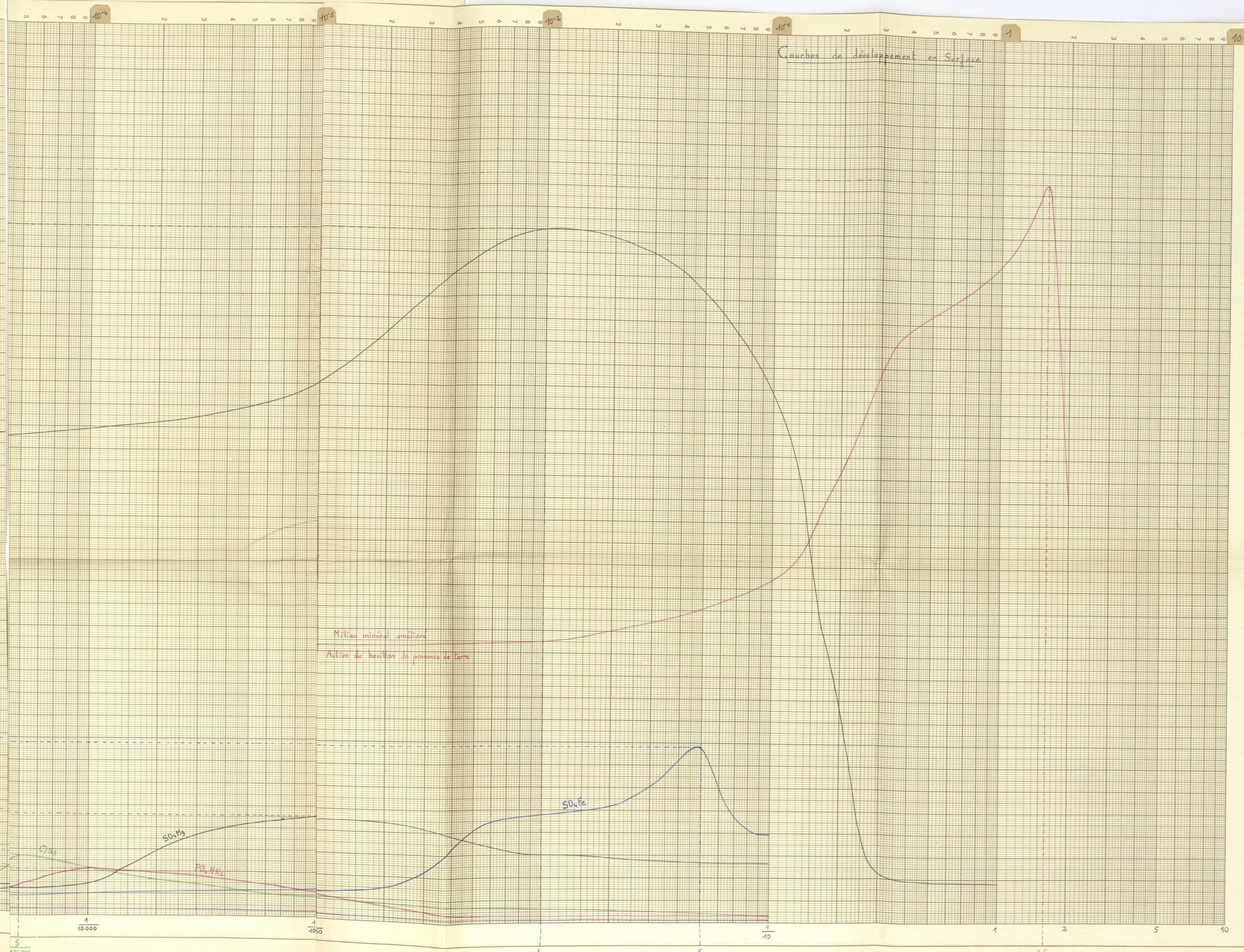
soit $8,280,10^6$ bactéries ou 8 milliards 280 millions pour la totalité du tube de culture, la détermination de ces valeurs n'ayant d'autre intérêt que de fournir un ordre de grandeur figurant la richesse des peuplements bactériens.

Nombre de bactéries

BILAN GENERAL



Courbes de développement en Surface



Concentrations



Forme en
bissac

Forme

mycélienne



Photographie du PERABACTERIUM SPELEI en milieu autotrophe

Grossissement : 25.000

(Cliché pris au microscope électronique)

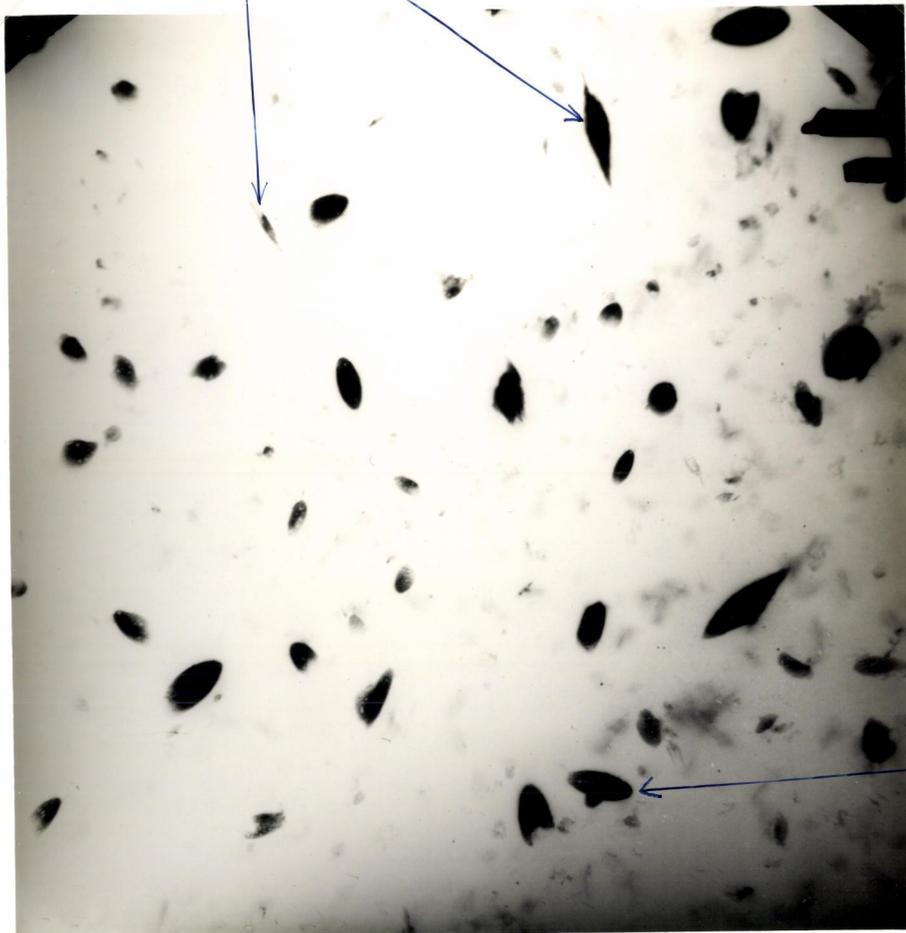
Nous distinguons :

- des formes mycéliennes
- des formes en bissac
- des pseudo-conidies d'environ $1/2 \mu$ de largeur
et 1μ de longueur
- et des aiguilles d'hydroxyde ferrique non encore hydratées

Aiguilles d'hydroxyde
ferrique, non délitées.

Forme pseudo-conidienne

- 120 -



Forme en

bourgeonnement



Photographie du PERABACTERIUM SPELEI en milieu hétérotrophe

Grossissement : 10 000 .

(Cliché pris au microscope électronique)

Nous observons des formes de dissémination pseudo-conidiennes,
elliptiques, d'environ $1/2\mu$ de largeur et 1μ de longueur.

Une forme en bourgeonnement est ici visible :

Le mode de multiplication par bourgeonnement propre
aux organismes autotrophes est en effet susceptible de persis-
ter en culture hétérotrophe

BIBLIOGRAPHIE

1. CAUMARTIN V. - 1957
La microflore des cavernes.
Notes biospéologiques, Tome XII, p. 59-64.

2. CAUMARTIN V. - 1957
Recherches sur une bactérie des argiles de cavernes et des sédiments ferrugineux.
Compte-rendu des séances de l'Académie des Sciences, Tome CCXLX,
p. 1758-1760.

3. CAUMARTIN V. et RENAULT P. - 1958
La corrosion biochimique dans un réseau karstique et la genèse du mondmilch.
Notes biospéologiques, Tome XIII, p. 87-109.

4. CAUMARTIN V. - 1959
Aspect morphologique et position systématique du Perabacterium spelei.
Bulletin de la Société de Botanique du Nord, 2e trimestre 1959.

5. CAUMARTIN V. - 1959
Quelques aspects nouveaux de la microflore des cavernes.
Annales de Spéléologie, Tome XIV, fasc. 1-2, p. 147-157.

6. POCHON J. et de BARJAC H.
Traité de Microbiologie des sols - 1958 - Dunod, Paris.

7. POCHON J.
Manuel technique d'analyse microbiologique du sol - 1954 - Masson et Cie, Paris.

8. SARTORY et MEYER
Microbiologie pratique - 1950 - L. Maloine, Paris.



TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
I. PRESENTATION DU PERABACTERIUM SPELEI	1
II. BUT A ATTEINDRE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES DE TRAVAIL	5
III. PLAN DES RECHERCHES EXPOSEES	10
IV. PREMIER ESSAI DE CULTURE - CONSTITUTION D'UN TUBE TEMOIN	12
V. ACTION DU PHOSPHATE DE POTASSIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI ..	15
VI. ACTION DU SULFATE DE MAGNESIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	24
VII. ACTION DU CHLORURE DE SODIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	32
VIII. ACTION DU SULFATE DE MANGANESE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	40
IX. ACTION DU SULFATE FERREUX SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	48
X. ACTION DU SULFATE FERRIQUE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	57
XI. ETUDE DES EQUILIBRES IONIQUES FAVORABLES AU BON DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	
A. Détermination du meilleur rapport ionique $\frac{Cl^-}{SO_4^{2-}}$	65
B. Choix des cations à introduire dans les milieux de culture	67
C. Recherche du meilleur rapport à accorder aux cations K et Mg	73
D. Etude de l'équilibre ionique entre sels ferreux et ferrique	77
XII. BILAN MINERAL	78
XIII. ACTION DE LA PEPTONE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	83
XIV. ACTION DU GLUCOSE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	90
XV. ACTION DU BOUILLON DE POMMES DE TERRE SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM	97
XVI. ACTION DE LA DUREE DE SEJOUR DES MILIEUX ENSEMENCES A L'ETUVE, SUR LE DEVELOPPEMENT DU PERABACTERIUM SPELEI	105
XVII. CONCLUSION - ETABLISSEMENT DU BILAN GENERAL	113
BIBLIOGRAPHIE	121

* * *

