

Sur les microbes thermophiles des sources thermales ¹⁾.

Par M^{lle} Tsiklinsky,

de l'Institut bactériologique de l'Université Impériale de Moscou.

Nous savons aujourd'hui que les microbes thermophiles sont largement répandus dans la nature. Leurs germes se trouvent dans le sol, dans l'eau, dans l'air, dans la neige nouvelle, etc., mais surtout dans les eaux thermales qui, chaudes, riches en sels minéraux, peuvent présenter à leur sortie du sein de la terre un milieu nutritif comparativement riche aux organismes inférieurs.

La haute température de certaines sources n'est pas un obstacle. Flourens a signalé en 1846 une algue vivante dans une source à 98°. Puis Brewer trouva dans un geyser à 83° des formes Nostoc. Ehrenberg observa tout un enchevêtrement d'algues vertes et rouges dans des sources thermales de l'île d'Ischia, à des températures de 63°—65°, supérieures à celles de la vie de la plupart des autres êtres ²⁾.

Ehrenberg a aussi observé, dans des eaux à 65°—68°, toute une série d'êtres vivants d'une organisation relativement supérieure, comme par exemple des mollusques, des arthropodes et des vers, et des constatations analogues ont été faites maintes fois par d'autres savants: des grenouilles et des poissons pourraient même vivre au-dessus de 55°.

Il est pourtant prudent de ne pas accepter ces données comme certaines. Des erreurs de température sont possibles. Souvent, les algues ne vivent pas dans l'eau de la source elle-même, mais sur ses bords, où la température n'est pas la même que dans l'eau. D'autre part, Hoppe-Seyler a vu dans une source à 55°, près de Bahaglia, des bandes de petits poissons, circulant rapidement dans toutes les directions. On aurait pu croire qu'ils supportaient en effet une température aussi élevée, tandis qu'en réalité l'eau qu'ils habitaient était une eau à 25° seulement, recouverte à sa surface de couches plus chaudes. Ceux d'entre eux qui se risquaient du côté de la surface n'échappaient à la mort que par une prompte fuite.

Toutefois, s'il peut y avoir quelque hésitation au sujet de la présence dans les sources thermales d'animaux élevés en organisation, il n'y en a pas au sujet des microbes, dont un certain nombre ont été décrits par MM. Cer-

¹⁾ Extrait des Annales de l'Institut Pasteur; lu dans la séance de la Société de physiologie le 26 mars 1899.

²⁾ Toutefois, il est bon de noter que ces températures élevées sont des *températures-limites*: d'après les observations faites, c'est la température de 55° qui se montrerait la plus favorable à la végétation des sources thermales.

tes et Garrigou, Karlinsky et Teich, comme nettement thermophiles: ce sont cinq espèces de bacilles, dont trois furent trouvées dans les eaux de Bosnie (51°—58°) et deux dans les eaux de Luchon, au sud de la France.

En raison du grand intérêt qu'offre l'étude de la population des eaux thermales, j'ai profité très volontiers de l'amabilité de M. le professeur Ogneff ⁴⁾, qui a mis à ma disposition plusieurs échantillons d'eaux thermales de l'île d'Ischia, provenant de trois sources différentes: on a pris deux échantillons de chacune. La température de ces trois sources était de 43°, de 51° et de 73°.

Une analyse préalable ayant montré que le nombre des germes de microbes thermophiles était faible partout, j'aiensemencé dans du bouillon quelques gouttes de chacun des échantillons. Sur six tubesensemencés, trois présentèrent déjà, dès le lendemain, un trouble; le quatrième ne se troubla qu'au bout de trois jours et les deux derniers restèrent stériles. De toutes ces cultures, je fis des plaques de gélose, et j'ai pu isoler ainsi six espèces de microbes thermophiles, qui tous se ressemblent d'après certains caractères morphologiques et biologiques. Ce sont tous des bâtonnets immobiles, se colorant par toutes les couleurs d'aniline et par la méthode de Gram. Tous sont des aérobies, car,ensemencés dans la gélose sucrée, d'après la méthode de Liborius, ils ne se développent qu'à la surface de la gélose. La plupart d'entre eux ont pour optimum de croissance 60°, bien que tous croissent encore à 70°. Le fait qui mérite surtout l'attention, c'est que tous ces microbes, sauf un seul, ne sont pas capables de se développer à 37° et au-dessous, de sorte que nous avons le droit de les classer parmi les microbes thermophiles absolus.

Je passe maintenant à la description de tous ces microbes en détail.

Bacille n° 1.—De la source à 51°, on isola un microbe présentant à côté de très longs filaments non ramifiés des bâtonnets relativement courts; pas de spores: colonies très épaisses au centre, s'amincissant vers la périphérie en forme de pétales multiples. C'est sur la gélose simple et glycinée que ce bacille végète le mieux; il en couvre toute la surface et ne s'en détache que difficilement.

L'addition du sucre agit défavorablement. Dans du bouillon il végète plus abondamment et ne pousse point sur la pomme de terre. Il ne liquéfie pas la gélatine. On n'a pas constaté d'amylase ni de sucrase. Je nommerai ce bacille *Bacillus thermophilus filiformis*.

Bacille n° 2.—On isola du même échantillon d'eau un court bâtonnet immobile, poussant rapidement sur les milieux nutritifs solides. Les spores sont placées presque à l'extrémité des bâtonnets, à petite distance du bout, qui alors paraît pointu. Il végète bien sur tous les milieux nutritifs solides et liquides, la pomme de terre seule exceptée.

C'est dans la gélatine qu'il pullule le plus abondamment; il ne la liquéfie pas et, généralement, ne manifeste la présence d'aucune diastase. Bien que l'optimum de sa croissance soit de 58°—60°, il pullule encore bien à 69°—

⁴⁾ Je prie M. le professeur Ogneff de vouloir bien accepter ici l'expression de ma sincère reconnaissance à ce sujet.

70°; mais ses caractères morphologiques changent à cette dernière température: le bâtonnet ne donne plus de spores. Réensemencé à 58°—60°, il forme de nouveau des spores. Ce bacille garde ces derniers caractères morphologiques également à 37°, mais dans ce dernier cas le développement n'est appréciable qu'au bout de 15 jours, tandis que, à sa température de prédilection, il apparaît en abondance en moins d'un jour. On n'a point observé de développement à la température de la chambre pendant un temps très long. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline; dans les spores on ne voit se colorer que la bordure.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus par des recherches faites sur l'eau de la source Castiglione, ayant une température de 73°.

En ensemençant dans du bouillon à 58° quelques gouttes de cette eau, on n'eut qu'au bout de 3 jours une culture présentant une grande variété de formes microbiennes rappelant les formes d'involution des bactéries, fait qui fut confirmé plus tard par des expériences. En effet, une culture en bouillon, obtenue avec cette même eau, mais à 70°, ne donna plus cette variété de formes, observée à 58°, mais bien des formes bacillaires ordinaires, et encore plus rapidement qu'à 58°, en moins de douze heures. On a retrouvé le même fait avec les bacilles 3 et 4 isolés de cette source, qui tous deux pullulent à 70° plus rapidement qu'à des températures plus basses, et y ont une croissance normale, tandis qu'à 58° ils donnent toujours des formes d'involution. Ce sont donc des bacilles thermophiles dans le sens absolu du mot.

Bacille n° 3 et 4.—Ces deux bacilles se ressemblent beaucoup: ce sont des bâtonnets immobiles, qui croissent bien sur tous les milieux nutritifs, et forment dans le bouillon une pellicule superficielle épaisse et glaireuse.

L'optimum de la croissance est près de 68°. Seulement l'un d'eux croît bien encore à 71°, coagule et digère le lait à 55°—58°, et, à 58°, donne plus vite des formes d'involution que l'autre. L'autre ne sécrète aucune diastase, et à 70° ne donne plus que des traces de croissance. De plus, les colonies du premier bâtonnet sont assez massives et épaisses au centre, et on ne peut en discerner la structure à l'aide d'un faible grossissement, tandis que celles du second sont transparentes, uniformément minces et ondulées.

Bacille n° 5.—Je ferai encore mention d'un microbe thermophile, isolé de la source à 51°. Ce microbe est un court bâtonnet, qui ne forme pas de spores. L'optimum de sa croissance est de 58°, mais il croît aussi bien à 37°; au-delà de 69° il ne se développe point. Il pousse sur tous les milieux nutritifs, sauf sur pomme de terre. Il possède une diastase protéolytique.

De cette même source j'ai isolé un microbe très ressemblant par tous ses caractères (pellicule sur bouillon, enduit sur pomme de terre, etc.) au *bacillus subtilis* ordinaire. Néanmoins ce microbe croît très bien à 57°, et par ce fait peut être classé au nombre des microbes thermophiles facultatifs. En le comparant avec une culture de *bacillus subtilis* du laboratoire, je pus me convaincre de la complète identité de leurs caractères morphologiques et biologiques, et constater aussi, à mon grand étonnement, que notre *bacillus subtilis* se montrait capable de pousser aussi à 57°, moins abondamment, il est vrai, qu'à 37°.

Ainsi, je trouvais un bacille thermophile non dans une source thermale,

mais dans une culture rajeunie au laboratoire pendant bien des années. Ce fait avait pour moi un intérêt capital, parce que, dans un premier travail, j'avais essayé d'élucider autant que possible la question des rapports entre les microbes thermophiles et les autres microbes.

Les microbes thermophiles forment-ils des groupes autonomes, sans aucun rapport avec les microbes ordinaires? Ou bien ceux-ci peuvent-ils, sous l'influence du milieu, acquérir provisoirement ou pour toujours, des propriétés de microbes thermophiles?

Tous les expérimentateurs, M. Cohn le premier, ont toujours admis que le *bacillus subtilis* ne croît pas au-dessus de 50°, et qu'à cette dernière température, sa croissance est à peine observable. Un grand nombre de savants ont eu affaire avec le même *bacillus subtilis*. L'existence d'une autre variété du même bacille, variété qui peut pousser à 57°—58°, m'a fait me demander si, en changeant les conditions d'existence du *bacillus subtilis* ordinaire, on ne réussirait pas à en faire une variété thermophile.

En effet, par desensemencements successifs, j'ai réussi à renforcer considérablement les propriétés thermophiles du *B. subtilis* de notre laboratoire. Au début, comme il a été dit plus haut, ce bacille se développait à 57°, mais faiblement: l'enduit qu'il formait à la surface de la gélose était très mince, et, au microscope, on voyait beaucoup d'individus morts. Quelques réensemencements successifs amenèrent un changement notable; à la 10-me génération on obtint déjà une croissance plus abondante sur la gélose, et le nombre des individus morts fut de beaucoup moindre que celui de la culture de départ.

Cette adaptation à une température graduellement élevée est cependant pénible, et doit être étroitement surveillée. Ainsi, ce microbe, qui, à sa trentième génération, croissait abondamment à 58°, cessait complètement de se développer à 58°,5.

Malgré cela j'espère pouvoir, en élevant lentement et graduellement la température des cultures, atteindre une température beaucoup plus élevée que la précédente.

Ce qui me confirme dans cet espoir, ce sont les résultats que Dallinger a obtenus dans la même direction, même avec certains infusoires flagellés. La température normale de la vie de ces animalcules est de 15°,5. En élevant graduellement et lentement la température du milieu de culture, Dallinger arriva à la porter à 23°. Mais, à ce niveau, la sensibilité des infusoires devint extrême: une différence d'un quart de degré dans la température produisait sur eux un effet nuisible, et il fallut des mois pour déterminer l'accoutumance aux hautes températures, qu'on poussa cependant jusqu'à 70°.

Très intéressants aussi sont les résultats que M. Davenport tira de ses expériences sur les têtards des crapauds. Il ne réussit, il est vrai, qu'à élever de 3°, 5, la température maxima du développement de ces animaux, mais il s'agissait ici d'animaux polycellulaires, représentants d'êtres d'une organisation élevée. La température de 40°, 5 était en moyenne celle à laquelle les têtards élevés dans des conditions normales, c'est-à-dire à environ 15°, tombaient à l'état de rigidité. Dans le cas où les têtards étaient préalablement élevés pendant 4 semaines à une température de 25°, la température de rigidité s'éle-

vait également, mais en proportion bien moindre, à savoir: de 3°, 5 seulement. L'influence de cette culture à 25° se conservait pendant un temps comparativement long, et persistait après même qu'on les eût ramenés à des températures plus basses.

De plus, Davenport signale que la cause d'une semblable adaptation ne peut être attribuée à une sélection artificielle, puisque tous les têtards cultivés à température élevée sont restés vivants. Par conséquent, c'est aux changements particuliers survenus dans leur protoplasma qu'il ramène leur très grande stabilité par rapport à la température.

Davenport admet même que c'est grâce à la diminution de la quantité d'eau du protoplasma que la vie devient possible à une température très élevée. A l'appui de cette opinion viennent certaines observations de M. Dallinger sur la structure du protoplasma des infusoires, dans le cas où on les cultive à des températures relativement hautes. Les vacuoles deviennent plus nombreuses, puis disparaissent graduellement, et l'eau qu'elles renfermaient s'élimine de l'organisme. Ce n'est qu'à la fin de ce processus que les infusoires pourront être soumis à l'action d'une température supérieure. D'un autre côté, on sait que l'albumine se coagule à une température d'autant plus élevée qu'elle contient moins d'eau. Il en est de même pour les diastases. Davenport en revient donc à l'idée, plusieurs fois émise, d'attribuer la résistance de certaines espèces à la chaleur à la même cause que celle à laquelle on attribue la résistance des graines et des spores. On peut objecter que la graine et la spore sont à l'état de repos, tandis que les microbes thermophiles ont, à des températures relativement élevées, une activité végétative supérieure à celle que manifestent les microbes ordinaires aux températures coutumières. Il y a tant de causes différentes qui peuvent expliquer, en dehors de la diminution de la proportion d'eau, la résistance du protoplasma à la coagulation par la chaleur, qu'il faut ne se fier à aucune hypothèse, tant qu'elle n'est pas appuyée sur des faits. Celle que je discute n'a encore aucune base, et je n'ai qu'à la signaler comme une explication plausible, mais non encore démontrée.

BIBLIOGRAPHIE.

- Hoppe-Seyler. *Arch. f. die gesammte Physiologie*, 1875.
 Brewer. *Americ Journ. of science and arts*. V, 41, p. 373, 1866.
 Flourens. *Comptes rendus* T. XXIII, p. 934.
 Sonnerat. Observation d'un phénomène singulier sur des poissons qui vivent dans une eau qui a 69° de chaleur. *Journal de Physique*, III, p. 256, 1774.
 Dallinger. *Journal of the Royal Micr. Soc.* III, p. 1—15, 1880.
 Ibid. *The Presidents address*. XI, p. 97—103, 1887.
 Ehrenberg. *Monatsber. K. P. Acad. Wiss.* Berlin, 1858, p. 488—495.

De Blainville 1824. Art. *Mollusques* dans le *Dict. des sciences naturelles*. T. XXXII, p. 141.

Plateau. Recherches phys. sur les articules aquatiques, 2-e partie. *Bull. Acad. roy. Sci. Belg.* XXXIV, p. 274—321.

Spallanzani. *Opuscules de physique animale et végétale*. Trad. p. 7. Senebier. 5 vs. 1777.

De Saussure. *Voyages dans les Alpes*. T. I—III, 1796.

Sachs. *Flora*. XXVII, p. 5—12. 1864.

Davenport and Castle. *Arch. Entwicklungs-mechanik der Organismen*, II, 2. S. 227, 1895.

Certes et Garrigou. *Comptes rendus*. T. CIII, p. 703.

Jeich. *Hygienische Rundschau*. 1896, 16.

Karlinsky. *Ibid.* 1895, 15.

B i b l i o g r a p h i e:

I. Analyses.

Gulewitsch, Wl. Prof. (Charkow). **Ueber das Arginin.** (Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 27, Ss. 178—215).

Das von *Schulze* und *Steiger* ¹⁾ im Jahre 1886 entdeckte Arginin $C_6H_{14}N_4O_2$ wurde von *Hedin* ²⁾ als Spaltungsprodukt von Hornsubstanz und überhaupt von Eiweisskörper erhalten. *A. Kossel* ³⁾ hat gefunden, dass das Arginin sich bei der Spaltung der Protamine sowohl durch Säuren wie durch Trypsin bildet, und durch die Untersuchungen von *Kutscher* ⁴⁾ ist festgestellt, dass es auch bei künstlicher Trypsinverdauung der Eiweisskörper entsteht. *Schulze* und *Likiernik* ⁵⁾ haben das Arginin in eine nahe Beziehung zu den Processen der Harnstoffbildung im Organismus gebracht; von *Schulze* und *Winterstein* ⁶⁾ wurde die Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins bewiesen; *Ellinger* ⁷⁾ hat gezeigt, dass das Arginin als Muttersubstanz des Putrescins betrachtet werden muss.

In Anbetracht dieser immer zunehmenden Bedeutung des Arginins für die Biologie hat der Verfasser den Vorschlag von *A. Kossel* angenommen, die Verbindungen von Arginin genauer kennen zu lernen, besonders diejenigen, welche für die Isolirung und die Identificierung dieser Base dienen können.

¹⁾ *E. Schulze* und *E. Steiger*. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 19, S. 1177; Ztschr. für phys. Chem., Bd. II, S. 43.

²⁾ *S. G. Hedin*. Ztschr. f. phys. Ch., Bd. 20, S. 186; Bd. 21, S. 155.

³⁾ *A. Kossel*. *Ibid.*, Bd. 22, S. 176. *A. Kossel* und *A. Mathews*. *Ibid.*, Bd. 22, S. 190.

⁴⁾ *Fr. Kutscher*. *Ibid.*, Bd. 26, S. 195.

⁵⁾ *E. Schulze* und *A. Likiernik*. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 24, S. 2701.

⁶⁾ *E. Schulze* und *E. Winterstein*. *Ibid.*, Bd. 30, S. 2879; Ztschr. f. phys. Ch., Bd. 26, S. 1.

⁷⁾ *Ellinger*. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 31, S. 3183.