Recherches microbiologiques dans la grotte de Topolniţa (Roumanie). Première note

par

Pelaghia Hodorogea

On présente les premiers résultats obtenus pour la mise en évidence des microorganismes de plusieurs types de substrats de la grotte de Topolniţa, par leur activité enzymatique et par l'ensemencement sur le milieu Topping.

Plusieurs travaux de spécialité (synthétisés récemment par Gounot, 1967) indiquent parmi les aliments des différents substrats trophiques pouvant être utilisés par les animaux cavernicoles, les bactéries, les actinomycètes et les champignons microscopiques.

On sait que beaucoup de microorganismes peuvent synthétiser les substances organiques nécessaires, directement à partir des substances anorganiques, par des processus de chimiosynthèse. C'est pour cette raison que dans les chaînes trophiques des grottes, et aussi dans d'autres milieux, ils ont une importance particulière comme source de substances énergétiques et, aussi bien, comme source d'oligoéléments (vitamines ou amino-acides) indispensables à la croissance des animaux.

Pour établir quelle est la place des microorganismes dans les chaînes trophiques de la grotte de Topolniţa (Mts. d'Olténie) nous avons effectué l'analyse microbiologique d'une série d'échantillons d'argile, de limon argileux, de mondmilch et de guano récoltés en mai 1971 et en octobre 1971, dans quelques stations fixées en vue de l'étude écologique de cette grotte.

La microflore de la grotte de Topolniţa n'a pas constitué, jusqu'ici, l'objet de recherches de ce genre. D'ailleurs, il n'y a presque pas de travaux sur la microbiologie des grottes de Roumanie. Cependant on peut citer ceux de Pop (1949) et de Decu et Papacostea (1964).

Trav. Inst. Spéol. «Emile Racovitza», t. XI, p. 335–342, Bucarest, 1972

Pour notre travail, cette dernière communication est intéressante parce qu'elle présente les bactéries, les actinomycètes et les champignons de l'argile et du guano de la grotte de Tismana, aussi bien que la microflore identifiée dans les tubes digestifs d'un coléoptère bathysciine (*Tismanella chappuisi* Jeann.).

Cette note présente les premiers résultats obtenus. Dans la première partie on présente les résultats des analyses effectuées pour la mise en évidence des microorganismes par leur activité enzymatique. Dans la deuxième, il s'agit du nombre des bactéries, des actinomycètes et des champignons présents dans les quatre types d'échantillons analysés.

Nous tenons à remercier P. Papacostea et Gh. Ştefanic pour leur précieuse aide à l'élaboration de ce travail.

La provenance et la nature des échantillons

Les quatre types de substrats nutritifs : guano, mondmilch, limon argileux et argile sablonneuse proviennent de plusieurs stations.

Les échantillons de *guano* ont été récoltés à différentes profondeurs (1—5 cm, 5—10 cm et 10—20 cm) dans un amoncellement de guano accumulé dans « Culoarul Liliecilor », à 70 m environ à partir de l'entrée de la grotte. Au cours des deux périodes de prélèvement (mai et octobre 1971) les chauves-souris étaient présentes au-dessus du tas de guano. La température du guano, à la surface, atteignait 16°C (en mai) et 14,1°C (en octobre) et l'humidité relative de l'air ambiant était descendue de 85% à 71%, aux mêmes dates.

Les échantillons de *mondmilch* ont été prélevés sur la paroi gauche de « Galeria Racoviţă », au lieu dit « La Coardă », situé à 400 m par rapport à l'entrée la plus proche. La température y atteignait à peu près 9,1°C lors des deux périodes de prélèvement et l'humidité relative était 99%. Le mondmilch était d'une blancheur immaculée et il était fort humide.

Les échantillons de *limon argileux* proviennent de « Sala Mare » au commencement de « Galeria Racoviţă », à 350 m distance de l'entrée, endroit où la température était de 9,9° — 10°C et l'humidité relative 98%. Ils ont été prélevés à la base des parois.

Enfin, les échantillons d'*argile sablonneuse* proviennent de « Galeria Racoviţă » près de « Lacul de cleştar », à approximativement 1 200 m distance de l'entrée. La température y était 9,8°C et l'humidité relative 99%.

Activité enzymatique

Dans le cadre d'une première série d'analyses nous avons vérifié l'existence ou l'inexistence d'exoenzymes dans les échantillons respectifs, des recherches récentes (Skujins, 1967) ayant démontré que la

présence des microorganismes dans des types divers de sol peut être mise en évidence d'une manière simple et complète par leur activité enzymatique.

Nous avons utilisé dans ce but les déshydrogénases, la catalase, la phosphatase et l'uréase.

Les déshydrogénases, enzymes impliquées dans les processus respiratoires anaérobes et aérobes, sont considérées à présent comme les meilleurs indicateurs de l'activité biologique globale (Skujins, 1967).

La catalase est, elle aussi, un enzyme lié à la respiration ; elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène. A noter que cet enzyme ne caractérise que la respiration aérobe.

La phosphatase met en liberté P_2O_5 à partir des esters phosphoriques. Elle caractérise très bien la fertilité du sol en fonction du phosphore. En même temps elle montre comment un substrat peut fournir aux différents microorganismes des composés minéraux phosphatiques.

L'uréase caractérise la possibilité d'un sol de fournir aux organismes végétaux des composés riches en azote.

L'activité déshydrogénasique a été déterminée par la méthode de Kiss (1965). Cette méthode est basée sur la réduction du triphénylttétrazole chlorate en formazan. La quantité de formazan indique l'intensité de l'activité déshydrogénasique du substrat respectif.

L'activité catalasique a été déterminée par la méthode de Ştefanic et Dumitru (1970), basée sur la réaction de couleur que donne le sulphate de titanyl en présence de l'oxygène dégagé par la décomposition de l'eau oxygénée. La quantité d'eau oxygénée décomposée par la catalase est calculée par rapport à 100 grammes de substrat sec.

L'activité phosphatasique a été déterminée par la méthode de Kroll et Kramer (1955), basée sur l'estimation de la quantité de phénol dégagée sous l'action de la phosphomonoestérase par le dinatriumphénylphosphate scindé.

Enfin, l'activité uréasique a été appréciée par la méthode de Kuprevici (1951) basée sur la détermination de la quantité d'ammonium dégagée de l'urée par l'enzyme.

Les résultats obtenus sur l'activité enzymatique dans nos échantillons sont présentés sous forme de tableaux.

Tableau 1

L'activité enzymatique dans les échantillons prélevés en mai 1971

Échantillon	Déshydrogénase (en mg formazan /100 g substrat sec)	Phosphatase (en mg phénol/100 g substrat sec)
Mondmilch	0	40,8
Limon argileux	0	28,6
Argile sablonneuse	0	24,6
Guano (1—5 cm de profondeur)	392,6	1 752
Guano (5—10 cm)	++	1 392
Guano (10—20 cm)	+	610

+, ++ indiquent la présence de l'enzime dans des quantités qui n'ont pas pu être dosées.

Tableau 2

L'activité enzymatique dans les échantillons prélevés en octobre 1971

Échantillon	Déshydrogénase (en mg formazan/100 g substrat sec)	Phosphatase (en mg phénol/100 g substrat sec)	Uréase (en mg NH_4/100 g substrat sec)	Catalase (en ml O_2/100 g substrat sec)
Mondmilch	0	61	44,8	762
Limon argileux	0	706	8 000	1671
Argile sablonneuse	0	40	19,2	637
Guano (1—5 cm de profondeur)	383,62	712	9 600	1 036
Guano (5—10 cm)	++	576	13 000	905
Guano (10—20 cm)	+	808	9 600	652

En analysant les chiffres des tableaux 1 et 2 on constate que :

1. Dans le *mondmilch* l'activité des déshydrogénases n'a pu être mise en évidence dans aucune des deux étapes de recherches (mai, octobre). L'activité phosphatasique est faible lors des deux périodes de prélèvement, mais supérieure d'environ 40% en octobre. L'activité de l'uréase a été observée seulement en octobre, et elle est assez forte. L'activité catalasique, spécifique aux microorganismes aérobes, est très marquée par rapport à un sol fertile.

2. Dans le *limon argileux* l'activité déshydrogénasique n'a pas pu être mise en évidence. L'activité catalasique est similaire à celle du mondmilch ; l'activité phosphatasique est marquée et l'activité uréasique est extrêmement vive.

3. Dans l'*argile sablonneuse* l'activité déshydrogénasique n'a pas pu être constatée ; l'activité catalasique a été moins marquée que dans le mondmilch et le limon argileux ; l'activité phosphatasique a été moins marquée que dans n'importe quel sol fertile, même par rapport au mondmilch et au limon argileux ; l'activité uréasique a été très faible.

4. Enfin, dans la couche superficielle du *guano*, l'activité déshydrogénasique est très intense en comparaison avec l'activité dans un sol fertile. On a pu établir clairement ce fait seulement pour la couche superficielle (1—5 cm), car à d'autres profondeurs, bien qu'on ait observé la couleur rouge spécifique de cette réaction, une série de substances colorées en brun, extraites avec l'acétone en même temps que le formazan, n'ont pas permis le dosage de la déshydrogénase.

L'activité catalasique est très forte à 1—10 cm de profondeur et diminue de 40% à peu près au-dessous de ce niveau.

L'activité phosphatasique est extrêmement intense (en comparaison avec un sol fertile) dans toutes les couches analysées. La dynamique des microorganismes varie avec la profondeur, en mai et en octobre, lorsque l'on constate une baisse de l'activité générale enzymatique.

L'activité uréasique, extrêmement intense dans toutes les couches (au moins 200 fois plus grande que dans un sol fertile !), est particulièrement vive dans la couche de 5—10 cm de profondeur.

Microflore

La seconde catégorie d'analyses microbiologiques a eu pour but l'identification de la microflore dans les mêmes échantillons.

Les colonies apparues dans les plaques ensemencées avec des dilutions de mondmilch, de limon argileux, d'argile et de guano ont indiqué par leurs caractères morphologiques (forme, dimensions, brillant, relief, profil, etc.) la présence des bactéries, des actinomycètes et des champignons dans toutes les cultures.

Pour l'ensemencement on a utilisé le milieu Topping (avec extrait de levure).

Les résultats obtenus figurent dans les tableaux 3 et 4. Le nombre des bactéries et des actinomycètes est donné en millions/gramme de substrat et celui des champignons, en milliers/gramme de substrat.

Tableau 3

Nombre de bactéries, d'actinomycètes et de champignons présents dans les échantillons prélevés dans la grotte de Topolnița, en mai 1971

Microflore	Guano			Mond-milch	Limon argi-leux	Argile sa-blon-neuse
	1–5 cm	5–10 cm	10–20 cm			
Groupe *Bacillus circulans*	1	11	8	0	2,832	0,033
Pseudomonas	113	0	0	0,480	1,700	0,010
Flavobacterium	86	0	0	0,120	0	0,010
Arthrobacter	1 218	6	1	0,288	0,324	0,033
Bactéries asporogènes indéterminées	138	6	1	0,086	0,324	0
Total bactéries	1 556	23	10	0,974	5,180	0,086
Actinomycètes	19	39	20	0,048	0	0,134
Total bactéries + actinomycètes (millions/gramme de substrat)	1 575	62	30	1,022	5,180	0,220
Champignons (milliers/gramme de substrat)	8	450	826	0	8	61

De ce tableaux on peut tirer les conclusions suivantes :

1. Dans le *mondmilch* le nombre des bactéries et l'activité enzymatique sont plus faibles en mai qu'en octobre. La flore bactérienne a été plus ou moins stable ; les cocci et les actinomycètes n'ont pas été mis en

Tableau 4

Nombre de bactéries, d'actinomycètes et de champignons présents dans les échantillons prélevés dans la grotte de Topolnița, en octobre 1971

Microflore	Guano			Mond-milch	Limon argileux	Argile sablonneuse
	1—5 cm	5—10 cm	10—20 cm			
Bacillus megaterium	0	0	0,688	0	0,908	0
Bacillus sphaericus	0	0	0	0	0	0,268
Groupe *Bacillus circulans*	0	0	0,688	0	2,131	0,121
Total bactéries sporogènes	0	0	1,376	0	3,039	0,389
Pseudomonas	0	0	0	7,885	4,876	0,783
Flavobacterium	0	0	0	3,504	6,706	0,465
Arthrobacter	104,175	0	0	6,490	11,282	1,913
Cocci	270,246	383,616	0	0	0	0
Bactéries asporogènes indéterminées	37,417	11,457	0,274	0	4,857	0,331
Total bactéries asporogènes	412,838	395,073	0,274	17,879	22,845	2,712
Total bactéries	412,838	395,073	1,650	17,879	25,884	3,101
Actinomycètes	13,181	0	6,945	0	0,595	0,305
Total bactéries + actinomycètes (millions/gramme de substrat)	426,019	395,073	8,595	17,879	26,479	3,406
Champignons (milliers/ /gramme de substrat)	425	520,5	760,3	1,8	79	16,1

évidence en octobre. La dominance des genres *Pseudomonas* et *Arthrobacter* en même temps que l'absence des bactéries sporogènes, indiquent la présence de sources organiques aisément assimilables et l'inexistence du processus d'humification.

Les champignons sont faiblement représentés dans ce substrat.

2. Dans le *limon argileux* le nombre total des bactéries et l'activité enzymatique sont relativement faibles par rapport à un sol de fertilité moyenne. Le nombre total des bactéries tend à diminuer en octobre.

Au cours du printemps, la flore bactérienne était dominée par les bactéries du groupe *Bacillus circulans* et par les espèces fluorescentes de *Pseudomonas*. Vers l'automne les substances azotées aisément assimilables deviennent plus rares ; c'est alors que le genre *Arthrobacter* domine.

Les champignons ont été relativement peu nombreux.

3. *Argile sablonneuse*. Dans ce substrat le nombre total des bactéries a été réduit en mai, mais important en octobre. En général, le nombre total des bactéries dans l'argile est comparable avec celui que l'on trouve dans un sol pauvre.

La flore bactérienne est dominée par des bactéries asporogènes, ce qui semble indiquer aussi une pénurie de substances azotées aisément assimilables et de faibles processus d'humification.

On y trouve plus de champignons que dans le mondmilch et le limon argileux.

4. Enfin, dans le *guano* le nombre de bactéries et d'actinomycètes est supérieur dans les 10 premiers cm, puis il diminue, peu à peu, avec la profondeur.

Le nombre de bactéries de la couche superficielle du guano (1—5 cm) est plusieurs fois supérieur à celui que l'on trouve dans les sols fertiles. Au contraire, les champignons sont plus nombreux dans les couches plus profondes.

La flore bactérienne trahit l'origine animale de ce substrat ; on y note spécialement le très grand nombre de cocci. Le guano de 10 à 20 cm de profondeur est radicalement différent du guano superficiel (1—5 cm) : les cocci y manquent totalement.

L'association d'actinomycètes et de bactéries sporogènes paraît indiquer la présence de certaines formes d'humus aux niveaux respectifs.

★

La comparaison de la flore microbienne identifiée au cours des deux périodes de recherches permet de dégager ces conclusions préliminaires :

1. Le *guano* représente le substrat le plus riche en microflore de tous ceux que nous avons analysés. Bien que le nombre de microorganismes ait varié d'un prélèvement à un autre, le sens de la variation des profondeurs différentes est resté le même.

2. Le *mondmilch* représente un milieu assez pauvre, dans lequel la population est dominée par des bactéries sporogènes.

3. Les *argiles* forment, à ce qu'il paraît, le milieu le moins favorable à la vie microbienne, mais elles se caractérisent d'autre part par une flore plus variée, dominée par les champignons.

Du point de vue de la population de microorganismes et de l'intensité de leur activité enzymatique, les échantillons récoltés dans les stations fixées dans la grotte de Topolnița en vue de recherches écologiques s'échelonnent de la manière suivante : argile sablonneuse, limon argileux, mondmilch et guano (dans ce dernier c'est la couche superficielle qui possède la microflore la plus riche et dont l'activité enzymatique est la plus marquée).

Bibliographie

1964 Decu V. und Papacostea P., *Anatomische und mikrobiologische Untersuchungen über einige Arten von höhlenbewohnenden Coleopteren aus Oltenien (Rumänien)*, Rovartani Közlemények, Folia Entomologica Hungarica, **XVII**, *6*.

1932 Dudich E., *Die Biologie der Aggteleker Tropfsteinhöhle « Baradla » in Ungarn*, Speläol. Monogr., Wien, **XIII**.

1967 Gounot M. A., *Recherches sur le limon argileux souterrain: son activité productrice dans la biocénose cavernicole*, Annales de Spéléologie, **XXII**, *1*.

1965 Kiss S., *Symposium on methods in soil biology*, Bucarest.

1951 Kuprevici V. F., *Biologuitcheskaia aktivnosti pocivy i metody eio opredeleniia*, Dokl. Akad. Nauk SSSR, **LXXIX**, *5*, 863—866.

1955 Kroll L. und Kramer M., *Der Einfluss der Tonmineralen auf die Enzymaktivität der Bodenphosphatase*, Naturwissenschaften, **42**, *6*, 157—158.

1949 Pop E., *Bacterii nitrificante în peștera de la Scărișoara*, Bul. științific, **I**, *9*.

1967 Skujins J. J., in : *Soil Biochemistry*, ed. by A. D. McLaren and H. Peterson, M. Dekker Inc., New York.

1970 Ștefanic G. et Dumitru L., *Détermination de l'activité de la catalase du sol par voie colorimétrique*, Biologie du sol. Bulletin International d'Informations, Paris, **12**, *12—13*.

1938 Topping E. I., *The predominant microorganisms in soils*. I, Zentr. f. Bakt., **II**, 97.

1964 Vandel A., *Biospéléologie. La biologie des animaux cavernicoles*, Paris.

1960 Varga L. und Takats T., *Mikrobiologische Untersuchungen des Schlammes eines wasserlosen Teiches der Aggteleker Baradla Höhle*, Acta Zool. Acad. Sc. Hung., *6*,

Faculté de Biologie, Laboratoire d'Écologie
Bucarest
Reçu le 15 janvier 1972