

MORPHOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET ÉCOLOGIE
DES ARTHROBACTER

PAR

E. G. MULDER et J. ANTHEUNISSE

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4067. — Extrait Juillet 1963. — Tome 105, pp. 46-74).

MORPHOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET ÉCOLOGIE DES ARTHROBACTER

par E. G. MULDER et J. ANTHEUNISSE

(Laboratoire de Microbiologie, Wageningen, Pays-Bas)

INTRODUCTION

Au cours d'une recherche sur la microflore des divers sols cultivés nous avons trouvé que plus de 60 p. 100 des colonies se développant sur gélose à l'extrait de sol et caséine étaient formées de cellules coccoïdes. En transportant ces bactéries sur un milieu frais de la même composition, nous avons constaté que dans un jeune stade les organismes se trouvaient sous forme de bâtonnets irréguliers. Cependant, quelques jours plus tard, les bâtonnets de la plupart des souches s'étaient transformés en cocci. Les caractères étant typiques pour les *Arthrobacter*, genre de la famille *Corynebacteriaceae* (Bergey 1957 [3]), nous avons pensé que nos souches étaient des représentants de ce genre.

Mais ce n'est pas seulement dans les sols que nous avons trouvé les *Arthrobacter*; nous avons isolé des organismes similaires en grand nombre de fromage (pâtes molles), de lait et d'eaux résiduaires, surtout de la boue activée.

Le nom « *Arthrobacter* » a été introduit par Conn et Dimmick en 1947 [12]. Les auteurs ont donné une description détaillée d'*Arthrobacter globiformis*, espèce décrite plus tôt par Conn sous le nom *Bacterium globiformis* [10]. Des organismes similaires ont été isolés et décrits comme Corynébactéries du sol par Jensen en 1934 [14]. D'après ce dernier auteur, ces organismes se trouvent universellement dans le sol. Ils sont aérobies, très pléomorphes, formant des bâtonnets irréguliers d'une longueur différente et quelquefois ramifiés. En vieillissant, les bactéries se transforment en cellules ovales ou coccoïdes. Il existe, selon Jensen, une similarité nette entre ces microbes et certaines espèces de Mycobactéries et de *Nocardia*.

Des investigations détaillées concernant la morphologie et la physiologie des *Arthrobacter* ont été exécutées par l'école de Lochhead et Katznelson au Canada [5, 7, 8, 20, 21, 22, 29, 30].

Les phénomènes qui se produisent pendant le cycle coccus-

bâtonnet-coccus ont été étudiés par Topping [33], Taylor [32], Sacks [26], Chaplin [7], Müller [25], Sundmann [31], Kuhn et Starr [19], Blankenship et Doetsch [4], Stevenson [29, 30], Starr et Kuhn [28]. Les besoins alimentaires des *Arthrobacter* ont été déterminés par Müller [25], Morris [23] et, en ce qui concerne les facteurs de croissance, par Lochhead et coll. [8, 20, 21, 22]. La biotine se révéla comme vitamine indispensable pour certaines souches d'*A. globiformis* [22]. La vitamine B₁₂ et la thiamine sont aussi décrites comme facteurs de croissance [22]. Une autre espèce, *A. terregens*, exigea une substance inconnue, le « facteur terre-gens », présent dans l'extrait de terre [20].

Le métabolisme hydrocarboné a été étudié par Morris [23] avec une souche d'*Arthrobacter globiformis*, et par Zagallo et Wang [36] avec cinq espèces différentes d'*Arthrobacter*.

Le but de nos investigations était de comparer les caractères morphologiques et physiologiques des trois groupes d'*Arthrobacter* isolés respectivement de sols, de fromages et de boues activées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons isolé environ 150 souches d'*Arthrobacter* des terrains d'expérience dans le jardin du Laboratoire de Microbiologie à Wageningen (sols sablonneux et argileux), d'une tourbe utilisée par le Dr Wieringa dans ses recherches d'humidification, et de plusieurs sols tropicaux de la Nigéria recueillis par le Dr Moore (Université d'Alberta, Edmonton, Canada). En outre on a isolé 50 souches de fromages dits « Meshanger » (pâtes molles), 4 souches de lait, 15 souches de boue activée (5 de celles-ci ayant une activité phénolytique). Les souches d'eaux résiduelles ont été isolées par MM. Adamse et van der Struik.

La méthode employée pour l'identification et le dénombrement des *Arthrobacter* du sol est la suivante. Des suspensions de terre en solution physiologique sont agitées pendant cinq minutes, des dilutions sont faites en solution de la même composition et ensuite on ensemence sur des plaques de la composition suivante : (H₂PO₄)₂Ca 0,25 ; HPO₄K₂ 1 ; SO₄Mg. 7 H₂O 0,25 ; SO₄(NH₄)₂ 0,25 ; caséine 1 ; extrait de levure 0,7 ; glucose 1 ; gélose 10 g par litre d'eau du robinet ; pH : 7,0. Après cinq jours d'incubation à 25° C on dénombre les colonies et transfère un grand nombre de celles-ci sur tubes de gélose de la même composition. Après incubation à 25° C pendant sept jours on teste les cultures à l'aide du microscope. Si les bactéries se présentent sous forme de cocci on les transfère sur tubes de gélose à l'extrait de levure (0,7 p. 100) et glucose (1 p. 100). Après incubation pendant vingt-quatre heures à 25° C on observe des cocci en germination, des bâtonnets de longueur variable, quelquefois ramifiés, et souvent deux cellules montrant une formation en V (« snapping »). Les identification et isolement des *Arthrobacter* des autres sources ont été exécutés de la même manière. Dans le cas du fromage on a pris des échantillons de l'extérieur, on a préparé une

suspension homogène en solution physiologique au moyen d'un mortier. Des dilutions de cette suspension ont été ensemencées sur plaques de la composition suivante : tryptone 5; extrait de levure 3; glucose 1; ClNa 10; gélose 10 g par litre d'eau du robinet.

Pour déterminer l'utilisation de différents corps carbonés on a fait usage du « replica test ». On transfère du matériel bactérien d'une plaque, ayant une composition polyvalente et portant des colonies de différentes souches d'*Arthrobacter* rangées régulièrement, à une série d'autres plaques contenant l'extrait de levure (0,1 p. 100) et un des corps carbonés (0,5 p. 100) qu'on veut tester. Pour ce transfert on emploie un disque d'une taille sensiblement identique à celle de la boîte de Petri et portant un certain nombre de pointes dont la position correspond au groupement des colonies. Avec ce disque, qui peut être stérilisé simplement par la chaleur, on peut transférer en même temps un grand nombre de souches. Pour déterminer l'utilisation d'un corps carboné on compare la croissance sur des plaques contenant seulement l'extrait de levure.

Milieu minéral A

HPO ₄ K ₂	1,0 g
SO ₄ Mg. 7 H ₂ O	0,3 g
Cl ₂ Ca. 2 H ₂ O	0,05 g
Cl ₃ Fe. 6 H ₂ O	0,01 g
SO ₄ Cu. 5 H ₂ O	0,1 mg
SO ₄ Zn. 7 H ₂ O	0,1 mg
SO ₄ Mn. 7 H ₂ O	1,0 mg
MoO ₄ Na ₂	0,01 mg
BO ₃ H ₃	0,01 mg
Cl ₂ Co	0,01 mg
Eau distillée en verre	1 l
pH	7,0

RÉSULTATS

MORPHOLOGIE

Pour la recherche de la morphologie des *Arthrobacter* nous nous sommes limités en général aux souches 1 et 166 d'*Arthrobacter globiformis*. Par comparaison on a étudié pour quelques détails les souches 252 et 268 des *Arthrobacter* isolés de fromage « Meshanger », une souche de *Cellulomonas* (*C. biazotea*, NCIB 8077), genre qui, d'après nous, est semblable aux *Arthrobacter*, quelques souches

PLANCHE I

FIG. 1 à 6. — *Arthrobacter globiformis*, souche 1, après un jour (fig. 1 et 4), deux jours (fig. 2 et 5) et trois jours (fig. 3 et 6) d'incubation sur gélose riche (à gauche) et pauvre (à droite). × 1 625.

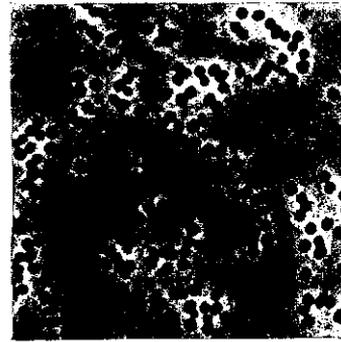
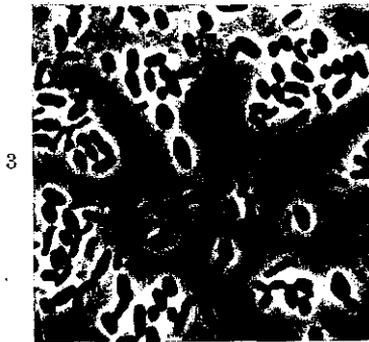
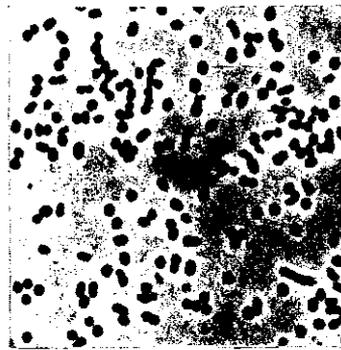
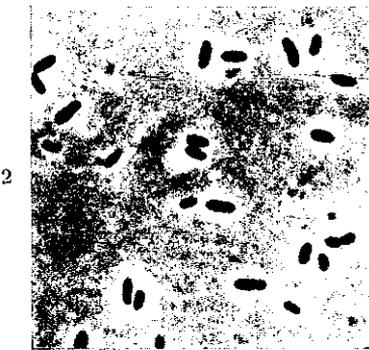
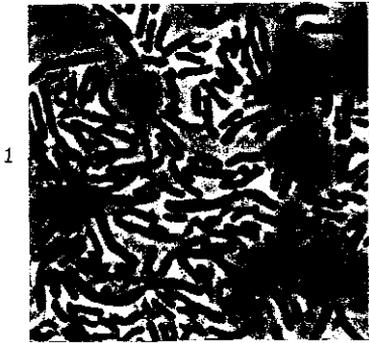
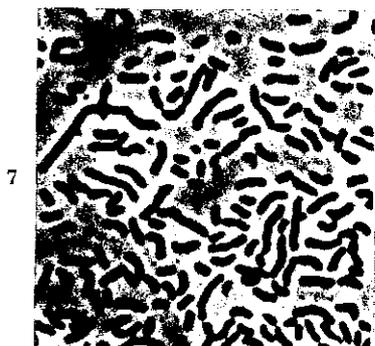


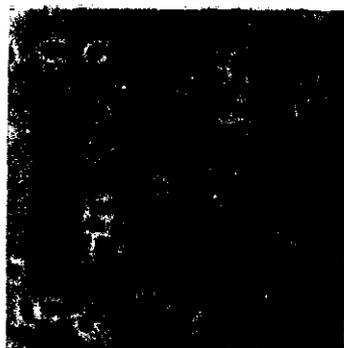
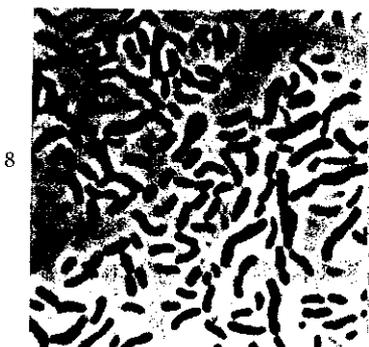
PLANCHE I.

PLANCHE II

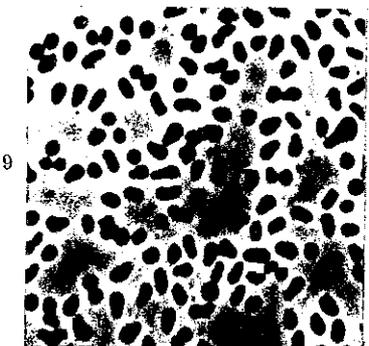
FIG. 7 à 12. — *Arthrobacter globiformis*, souche 166, après un, deux et trois jours d'incubation sur gélose riche (fig. 7, 8 et 9 respectivement) et après six, dix-huit et quarante-huit heures d'incubation sur gélose pauvre (fig. 10, 11 et 12 respectivement). $\times 1\ 625$.



10



11



12

PLANCHE II.

PLANCHE III

FIG. 13 à 20. — *Arthrobacter globiformis*, souche 166, sur gélose pauvre, photographiée après une heure, quatre heures et demie, sept heures et demie, onze heures et demie, treize heures et demie, dix-huit heures et demie, vingt-trois heures et demie et trente-quatre heures d'incubation. $\times 1\ 625$.

FIG. 21. — *A. globiformis*, souche 166, en milieu liquide à l'extrait de levure, 0,1 p. 100 et glucose 1 p. 100. $\times 1\ 200$.

FIG. 22. — En milieu liquide à citrate de soude 1 p. 100 et azote minéral. $\times 1\ 625$.

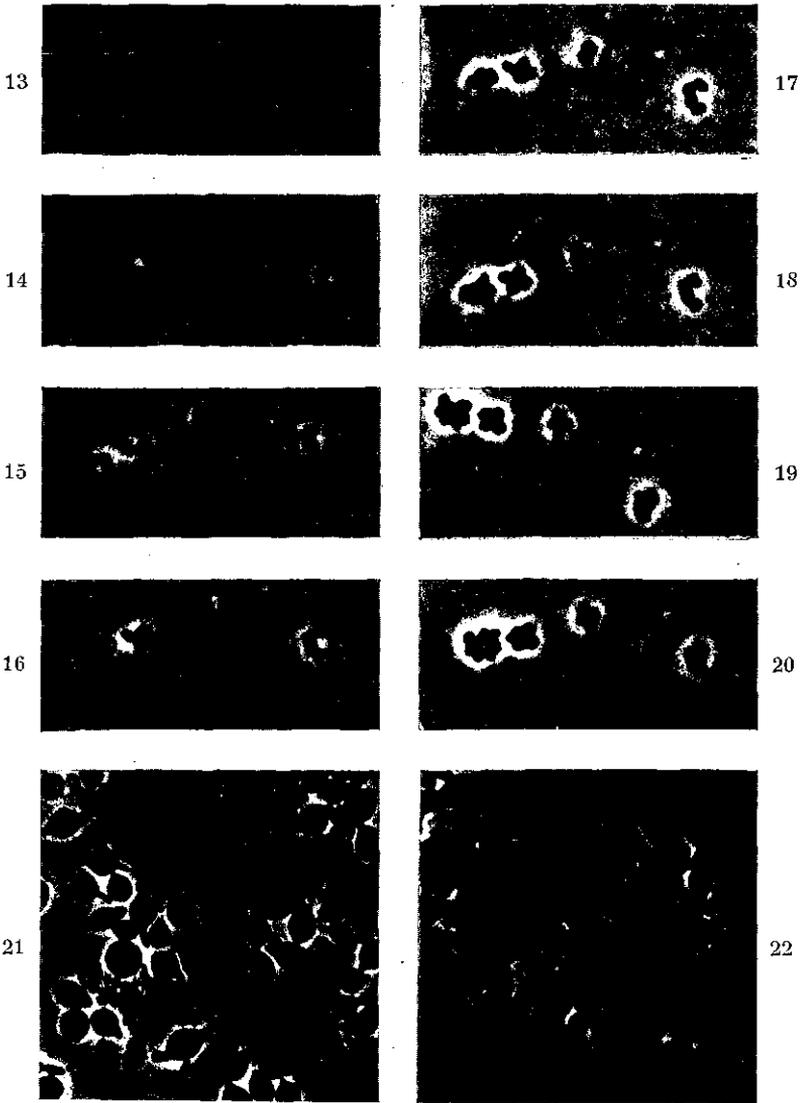
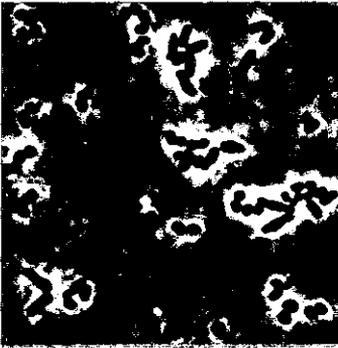


PLANCHE III.

PLANCHE IV

FIG. 23 à 28. — *Brevibacterium linens* : Fig. 23 après deux semaines d'incubation sur gélose riche (0,7 p. 100 extrait de levure et 1 p. 100 glucose) ; fig. 24, quatorze heures et fig. 25, vingt-quatre heures après transfert du matériel de fig. 23 sur milieu frais de la même composition ; fig. 26 à 28 après deux semaines d'incubation en milieu liquide à l'extrait de levure 0,7 p. 100 et glucose 0,1 p. 100 (fig. 26 et 27) ou 2 p. 100 (fig. 28). $\times 1\ 625$.

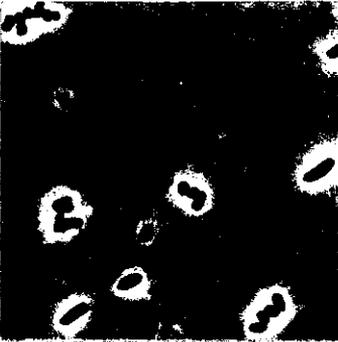
23



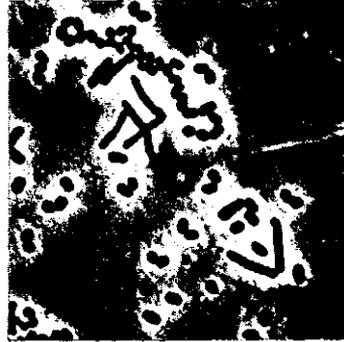
26



24



27



25



28

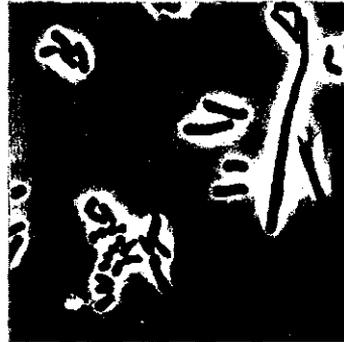


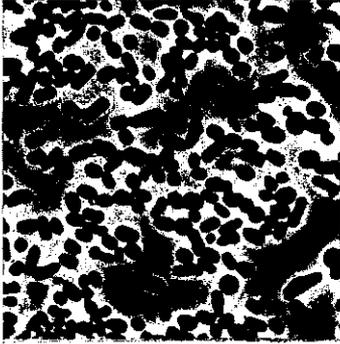
PLANCHE IV.

PLANCHE V

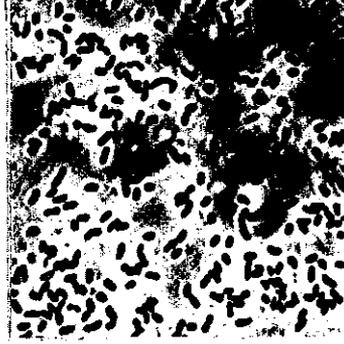
FIG. 29 à 31. — *Mycobacterium phlei* : Fig. 29, après huit jours d'incubation à 30° C sur gélose à la caséine ; fig. 30, cinq heures et fig. 31, vingt-quatre heures après transfert du matériel de fig. 29 sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100, et glucose 1 p. 100.

FIG. 32 à 34. — *Cellulomonas birazolea* : Fig. 32 après six jours d'incubation sur gélose de caséine ; fig. 33, huit heures et fig. 34, vingt-quatre heures après transfert du matériel de fig. 32 sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100 et glucose 1 p. 100.
× 1 625.

29



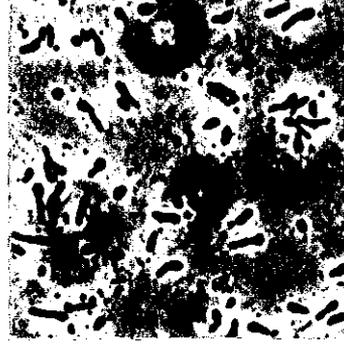
32



30



33



31



34



PLANCHE V.

PLANCHE VI

FIG. 35 à 37. — *Arthrobacter* du fromage (souche 252) : Fig. 35, après six jours d'incubation à 30° C sur gélose à caséine ; fig. 36, huit heures et fig. 37, trente-six heures après transfert du matériel de fig. 35 sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100 et glucose 1 p. 100. $\times 1\ 625$.

FIG. 38 à 40. — *Arthrobacter globiformis*, souche 166 : Fig. 38 en culture liquide minimale ; fig. 39, quatre heures et fig. 40, trente-quatre heures après l'addition de l'extrait de levure 0,1 p. 100 et glucose 1 p. 100. $\times 1\ 200$.

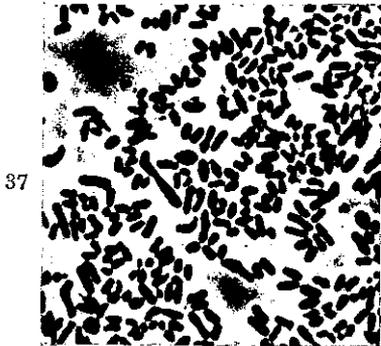
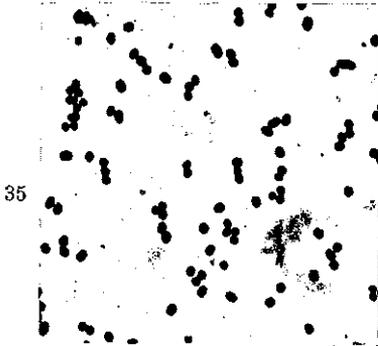


PLANCHE VI.



de *Brevibacterium linens*, organismes probablement identiques aux *Arthrobacter* de fromage, et *Mycobacterium phlei* qui montra une morphologie à peu près identique à celle d'*Arthrobacter*.

PROLIFÉRATION SUR DES MILIEUX SOLIDES. — Dans une première série d'expériences nous avons cultivé les deux souches 1 et 166 d'*Arthrobacter globiformis* en tubes sur un milieu solide de la composition suivante : a) extrait de levure, 0,1 p. 100, et gélose « Davis », 1 p. 100, en extrait de terre (deux litres obtenus de 1 kg de sol argileux); b) extrait de levure, 0,7 p. 100; glucose, 1 p. 100, et gélose « Davis », 1 p. 100, en extrait de terre. Après l'inoculation avec une culture sous forme de cellules coccoïdes, nous avons fait des observations à l'aide du microscope à contraste de phase après un, deux et trois jours d'incubation à 25° C. Nous avons constaté une influence nette de la nourriture des *Arthrobacter* sur leur morphologie (pl. I et II, fig. 1 à 12).

Sur la gélose pauvre en substances nutritives, les cellules coccoïdes germèrent et formèrent des bâtonnets courts. Après chaque division la longueur des bactéries fut réduite et, après trois jours d'incubation, il n'y avait que des cellules coccoïdes. Quoique les deux souches se comportassent de la même façon, les cellules de la souche 166 étaient plus larges que celles de la souche 1.

Sur les milieux plus riches en substances nutritives, on observa la formation de bâtonnets beaucoup plus longs que ceux des milieux pauvres, avec des ramifications courtes et avec des formes irrégulières comme elles sont décrites pour les diphtéroïdes. Fréquemment les cellules divisées prirent une position en V (« snapping ») ou en palissade. En vieillissant, la longueur des cellules fut fortement réduite.

Des cultures de trois jours contenaient principalement des grandes cellules ovales ou rondes, nommées « cystites » par Jensen [14].

CULTURES EN GÉLOSE SUR LAME. — Pour savoir si les cellules coccoïdes se forment par une réduction graduelle de la longueur des bâtonnets au cours de la prolifération ou par la formation simultanée d'un certain nombre de cloisonnements transversaux dans les cellules longues, nous avons cultivé *A. globiformis*, souche 166, en culture de gélose sur une lame placée sous le microscope, de sorte qu'il était possible d'étudier et de photographier le développement d'une même cellule. L'ensemencement exécuté en milieu pauvre (gélose 0,5 p. 100 à l'extrait de terre et 0,05 p. 100 extrait de levure), nous avons constaté que les bâtonnets courts qui se formèrent après la germination des cocci introduits par l'inoculation des cultures, se transformèrent de nouveau en cocci après quelques divisions et se multiplièrent encore quel-

quefois sous cette forme (pl. III, fig. 13 à 20). Cette observation est importante, parce qu'elle montre nettement que les cellules coccoïdes ne se trouvent pas toujours dans un état de repos (« arthrospores »), mais dans une condition de croissance réduite.

La même expérience, exécutée en gélose relativement riche en substances nutritives, donna une prolifération abondante de cellules sous forme de bâtonnets de longueur modérée. Des cellules filamenteuses et ramifiées, qui se développent normalement sur gélose riche en substances nutritives ou en milieu liquide, étaient rares dans les cultures sur lamelle. Après un certain nombre de divisions, quand la concentration de substances alimentaires diminua, la longueur des bâtonnets fut réduite et finalement ceux-ci se transformèrent en cellules coccoïdes. On voit donc que, dans les conditions de cette expérience, les cocci se formèrent par une réduction graduelle de la longueur des bâtonnets.

PROLIFÉRATION EN CULTURE LIQUIDE. — Nous avons comparé la morphologie des souches 1 et 166 d'*A. globiformis* des souches 252 et 268 d'*Arthrobacter* de fromage et d'une souche de *Brevibacterium linens*. Nous avons cultivé ces organismes en solution minérale A, additionnée de 0,72 g NO_3NH_4 et 5 g glucose par litre (40 ml de solution en fioles d'Erlenmeyer de 300 ml). Une deuxième série de cultures fut additionnée de 3,57 g par litre d'hydrolysate de caséine (sans vitamines), et une troisième série en outre de 3,5 g par litre d'extrait de levure. Les deux souches d'*A. globiformis* proliférèrent vigoureusement dans tous les milieux; les autres souches exigèrent des acides aminés, tandis que leur croissance fut stimulée par l'extrait de levure, probablement grâce aux vitamines se trouvant dans cet extrait.

Après un jour d'incubation à 29° C, la plupart des cultures consistaient en bâtonnets courts en position V. L'addition des acides aminés n'influença pas fortement la morphologie des cultures. En présence d'extrait de levure, certaines cellules étaient plus larges et quelquefois plus longues avec des gonflements irréguliers.

Un jour plus tard, la plupart des bâtonnets des cinq cultures s'étaient transformés en cellules ovales et coccoïdes, apparemment par réduction graduelle de la longueur des cellules proliférantes. La souche 1 cependant, particulièrement en présence d'extrait de levure, contenait un grand nombre de cellules d'une longueur de 3-8 μ . Quelques jours plus tard ces cellules, probablement par segmentation, se désintégrèrent en cocci.

Cette désintégration de cellules filamenteuses en cocci a été constatée de même dans une autre expérience, avec *Brevibacterium linens* en milieu liquide (pl. IV, fig. 23 à 28), et avec *Mycobacterium phlei* sur culture de gélose (pl. V, fig. 29 à 31).

Les résultats de ces expériences montrent clairement qu'il y a au moins deux façons de former des cellules coccoïdes :

- a) Par raccourcissement graduel des bâtonnets proliférants;
- b) Par désintégration subite des cellules filamenteuses.

CELLULES ANORMALES. — Fréquemment les cultures d'*Arthrobacter* contiennent un certain nombre de cellules ovales ou rondes d'un diamètre de plus de 4 μ , ressemblant à des levures. Quelquefois, surtout en milieu liquide, ces cellules peuvent être beaucoup plus nombreuses (pl. III, fig. 21). Elles possèdent deux tubes polaires, une croix à leur surface et elles sont incapables de proliférer comme celles de dimensions inférieures. Probablement ces cellules sont formées par gonflement de cocci en germination.

Outre les cellules en forme de citron on trouve, comme nous l'avons vu ci-dessus, surtout sur des milieux riches, des cellules ovales ou sphériques d'un diamètre de 2-4 μ , dites « cystites » par Jensen [14] et Chaplin [7].

En présence de citrate comme source de carbone, on a observé une croissance floconneuse causée par la formation de cellules anormales (pl. III, fig. 22).

Nous avons déterminé avec 45 souches d'*Arthrobacter* du sol et 50 souches d'*Arthrobacter* du fromage, la capacité de former de grandes cellules par culture pendant un mois sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100 et glucosé 2 p. 100. Les résultats furent les suivants (tableau I). On voit que la plupart des souches d'*Arthro-*

TABLEAU I. — Formation de cellules de différentes dimensions par des souches d'*Arthrobacter*.

ORIGINE DES SOUCHES	NOMBRE DES SOUCHES	POURCENTAGES DES SOUCHES AVEC CELLULES DE DIMENSIONS (en μ)			
		> 4 (Citrons)	3-4	2-3	< 2
Sol	45	9	16	62	13
Fromage	50	0	0	88	12

bacter du sol et du fromage étaient capables de former des « cystites » de 2-3 μ . Des cellules de plus de 3 μ ne furent formées que par un certain nombre de souches d'*Arthrobacter* du sol.

GERMINATION DES COCCI. — La germination des cellules coccoïdes est un phénomène caractéristique pour les *Arthrobacter*. Après repiquage sur un milieu nutritif frais on constate un gonflement

des cellules, suivi par l'apparition des tubes de germination qui se transforment en bâtonnets de longueur variable, comme nous l'avons décrit ci-dessus (pl. V et VI, fig. 32 à 40).

Fréquemment on peut observer la formation de deux et rarement de trois tubes de germination par cellule (pl. VI, fig. 40). Quoique ce phénomène se produise le plus souvent chez les cocci d'un diamètre de plus de 2 μ , il se présente aussi chez les petits cocci.

D'après Chaplin [7], la germination des « cystites » serait différente de celle des cocci normaux. Les « cystites », après germination bipolaire, formeraient des tubes contenant de petites cellules coccoïdes. En observant sous le microscope la germination des « cystites » de la souche 166 d'*Arthrobacter globiformis* en gélose de caséine diluée, nous n'avons pas constaté une différence essentielle entre la germination des « cystites » et celle des cocci normaux. Cependant nous avons pu confirmer l'observation de Chaplin que les « cystites », après la germination bipolaire, se partagent en deux parties.

PHYSIOLOGIE

a) LA RÉACTION DE GRAM.

Cette réaction a rencontré beaucoup d'intérêt chez les chercheurs étudiant les *Arthrobacter*. Selon Conn et Dimmick [12], les cellules en bâtonnets seraient Gram-négatives, les cellules coccoïdes, Gram-positives. Chez les diphtéroïdes, Corynébactéries provenant des animaux et de l'homme au contraire, les cellules jeunes seraient Gram-positives et elles auraient tendance à se transformer en Gram-négatives en vieillissant.

Nous avons déterminé la réaction de Gram de 111 souches d'*Arthrobacter* isolées du sol, 50 souches du fromage et du lait et 14 souches de boue activée. 8 souches de Corynébactéries phytopathogènes, 2 de *Cellulomonas*, 2 du genre *Microbacterium*, 3 de *Brevibacterium linens* et 1 de *Mycobacterium phlei* furent testées. On a fait les colorations avec des cellules jeunes (bâtonnets), cultivées pendant vingt-quatre heures sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100, glucose 1 p. 100, à une température de 30° C, et avec des cocci obtenus après culture sur gélose à la caséine pendant huit jours à 30° C. Les résultats de ces recherches sont résumés dans le tableau II. On voit une différence nette entre les différents groupes d'*Arthrobacter* vis-à-vis de la réaction de Gram. Les formes jeunes (cellules bâtonnets) de la plupart des souches d'*Arthrobacter* isolées des sols sablonneux et argileux hollandais et nigériens étaient ou Gram-négatives ou Gram-variables. En comparant la coloration des cellules en bâtonnets et coccoïdes, il apparut que 22 p. 100 des 111 souches s'étaient transformées de Gram-négatives en Gram-variables ou de Gram-variables en Gram-positives.

TABLEAU II. — Réaction de Gram des différents groupes d'Arthrobacter.

ORIGINE DES ARTHROBACTER	NOMBRE DE SOUCHES	BATONNETS			COCCI		
		Gram +	Gram var.	Gram —	Gram +	Gram var.	Gram —
Sol sablon- neux	45	6	18	21	3 2	2 5 14	1 11 7
Sol argileux ..	24	0	6	18		2	6 16
Sol tourbeux .	10	5	2	3	4 1	1 1 1	2
Sol de prairie.	15	6	4	5	6	3 1	1 4
Sol nigérien ..	17	4	7	6	4 3	2 1	2 5
Lait	4	2	2	0	2 2		
Fromage	46	39	7	0	36 4	3 3	
Boue activée .	9	1	3	5	1	1	3 4
Boue activée (activité phé- nolytique)	5	4	1	0	4	1	
Corynébacté- ries phytopa- thogènes	8	8	0	0	8		/
<i>Cellulomonas</i> ..	2	0	0	2			2
<i>Mycobacterium</i> <i>phlei</i>	1	1	0	0	1		
<i>Microbacterium</i>	2	1	1	0	1 1		
<i>Brevibacterium</i> <i>linens</i>	3	3	0	0	3		

tives. Cependant, chez 56 p. 100 des souches la réaction de Gram dans les formes jeunes et âgées était la même, et chez 22 p. 100 on put constater un changement de Gram-positif en Gram-variable ou de Gram-variable en Gram-négatif.

Les souches provenant du fromage étaient pour la plupart Gram-positives pour les deux formes de cellules. Les souches isolées de la boue activée réagirent comme les *Arthrobacter* du sol. Les 5 souches à activité phénolique avaient des cellules qui étaient Gram positives.

Les Corynébactéries phytopathogènes, les Microbactéries, les *Brevibacterium linens* et *Mycobacterium phlei* se comportèrent comme les *Arthrobacter* du fromage, les 2 souches de *Cellulomonas* comme les *Arthrobacter* du sol.

b) NUTRITION.

ALIMENTS CARBONÉS. — L'effet des différents corps carbonés sur la croissance des *Arthrobacter* fut testé sur des plaques de gélose contenant 0,1 ou 0,15 p. 100 d'extrait de levure et 0,5 p. 100 des corps à essayer. Les résultats de cette expérience, présentés dans le tableau III, montrent l'existence de différences nettes entre les différents groupes d'*Arthrobacter*. Les souches isolées de sols sablonneux et argileux et de boue activée se ressemblent nettement. La plupart des souches de ces trois groupes sont capables de proliférer vigoureusement sur les corps carbonés employés dans cette expérience, excepté le « Tween-80 ».

TABLEAU III. — Pourcentages des souches d'*Arthrobacter* utilisant divers corps carbonés.

ORIGINE DES <i>Arthrobacter</i>	NOMBRE DE SOUCHES	GLUCOSE	SACCHAROSE	LACTOSE	GLYCÉROL	CITRATE	AMIDON	ACIDE GLUTAMIQUE	TWEEN-80	GÉLATINE
Sol sablonneux	40	100	95	93	98	98	73	86	13	86
Sol argileux	25	100	100	100	100	100	84	76	8	76
Sol tourbeux	12	75	50	25	34	50	17	17	17	50
Prairie permanente	18	89	83	39	83	83	6	83	6	61
Fromage	46	87	7	30	11	93	22	43	7	33
Boue activée	10	100	80	90	100	100	80	100	0	90

Les souches provenant de prairies permanentes sont apparemment différentes de celles isolées des autres sols, la capacité d'utiliser l'amidon et le lactose étant moins fréquente. Les souches

isolées du sol tourbeux sont de même différentes, se caractérisant par des capacités biochimiques inférieures. Quant aux souches du fromage, on constate l'absence de l'utilisation de saccharose, amidon et glycérol chez la plupart des souches.

CORPS AZOTÉS ET VITAMINIQUES. — Selon Conn et Dimmick [12] les *Arthrobacter* du sol seraient capables d'utiliser l'azote sous forme inorganique, nitrate ou sel ammoniacal, en l'absence de vitamines. Cette observation n'est qu'en partie en accord avec les observations de Jensen [14] qui a étudié les besoins azotés d'un bon nombre de Corynébactéries et Mycobactéries du sol. Certaines espèces de Corynébactéries du sol, de Jensen, étaient capables d'assimiler l'azote sous forme inorganique. D'autres souches cependant exigèrent de la peptone pour obtenir une prolifération vigoureuse. Les Mycobactéries du sol, testées par Jensen, étaient en général capables d'utiliser l'azote minéral. La décomposition des hydrocarbures, propriété typique des Mycobactéries, n'avait cependant pas lieu chez un certain nombre de souches en présence d'azote minéral, mais se réalisa en présence de peptone. Celle-ci contenant des vitamines, il est possible que ces facteurs de croissance et non pas l'azote organique aient été responsables de l'effet favorable de la peptone. La même conclusion peut être tirée du travail de Taylor [32] qui a rapporté que 17, parmi 106 souches d'*Arthrobacter* du sol testées, étaient capables de proliférer sur nitrate; les autres souches exigèrent l'extrait de levure pour donner une croissance satisfaisante. Morris [23] et Chan et Stevenson [5], travaillant avec une souche d'*Arthrobacter globiformis*, obtinrent une bonne croissance avec nitrate ou sel ammoniacal comme source azotée, en présence de biotine. Ces résultats ont été confirmés par Veldkamp [34, 35] étudiant la sécrétion d'acides aminés par quelques souches d'*Arthrobacter globiformis* de notre collection en milieu liquide avec azote ammoniacal.

Nous avons étudié l'alimentation azotée d'un grand nombre de souches d'*Arthrobacter* d'origine différente en présence ou absence de certaines vitamines. Nous avons employé le milieu minéral A, contenant 5 g de glucose et 0,25 g d'azote par litre sous forme de NO_3NH_4 ; pH 7,0. L'eau utilisée avait été distillée en verre, les substances nutritives étant des corps très purs. On a cultivé les bactéries dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 ml, contenant 50 ml de solution nutritive, en culture stagnante. Les fioles avaient été nettoyées rigoureusement avec du réactif sulfochromique et lavées avec de l'eau distillée en verre. Pour prévenir l'introduction des substances vitaminiques avec l'inoculum, nous avons inoculé une goutte d'une suspension bactérienne en solution physiologique dont le trouble était très faible. Toutes les souches employées avaient été cultivées sur gélose à l'extrait de levure et glucose. Après une

TABLEAU IV. — Relation entre l'alimentation azotée et vitaminique, la réaction de Gram et l'utilisation des corps carbonés.

Origine d'Arthrobractet	Nombre des souches	Souches proliférant sur				Réaction de Gram			Souches utilisant				Gélatine
		NH ₄ NO ₃		Acides aminés		de cultures de			Saccharose	Lactose	Glycérine	Amidon	
		Sans vitamines	Biotine	Sans vitamines	Biotine	24 heures	±	+					
Sol sablonneux	45	21	20	1	1	3	8	10	21	20	21	17	18
						2	8	10	20	20	20	15	19
				1				1	1	1	1	0	1
						2	1	1	0	0	0	0	0
									0	2	1	0	1
Sol argileux	25	9						1	9	9	9	9	9
								4	16	16	12	10	10
Sol tourbeux	10	2				1	1	1	2	2	2	1	1
						1	1	3	2	0	0	0	1
						3	3	2	2	1	1	0	3
Sol de prairie	16	8	8			6	1	1	7	6	8	0	3
						3	3	2	7	8	8	1	7
Sol nigérien	16	2	7	7				4	2	—	—	—	—
						4	3	3	—	—	—	—	—
Lait	4					4	2	2	0	0	0	0	1
Fromage	46	10	3	11		9	1	1	0	0	1	0	0
						3	3	3	0	0	0	0	0
						8	3	3	0	2	1	1	1
						14	14	14	2	11	1	8	12
						5	3	3	1	1	2	1	2
Boue activée	10	1	9			1	3	5	1	1	1	0	0
						4	1	1	7	8	9	8	9
Boue activée (activité phénylétique)	5	5				4	1	1	—	—	—	—	—
Corynebactéries	8			2		2			—	—	—	—	—
Phytopathogènes						6	6		—	—	—	—	—
Cellulomeng	2			2				2	—	—	—	—	—
Microbacterium	2			1		1	1	1	—	—	—	—	—
Mycobacterium	1	1				1	1	1	—	—	—	—	—
Brevibacterium	3			1		1	1	1	—	—	—	—	—
Linens						1	1	1	—	—	—	—	—

incubation pendant cinq jours à 29° C on a mesuré la densité de la suspension à l'aide d'un néphélomètre EEL.

Si la croissance d'une certaine souche dans ce milieu était nulle, on ajoutait 0,25 µg de biotine par culture (5 µg par litre). Si, en présence de biotine, la croissance était encore très faible, on

ajoutait un mélange d'un grand nombre de vitamines (biotine 2, acide folique 20, riboflavine 100, thiamine 100, pyridoxine chlorhydrique 100, acide nicotinique 100, pantothénate de calcium 100, acide p-aminobenzoïque 100, cyanocobalamine (vitamine B₁₂) 1 µg par litre). La croissance après cette addition étant encore minime on a ajouté 100 mg d'hydrolysate de caséine pour contrôler si la solution contenait encore des germes viables.

Si nous obtenions une croissance satisfaisante d'une certaine souche en absence de biotine ou des autres vitamines, nous vérifions l'absence d'un besoin vitaminique de cette souche par transfert d'une petite quantité de la culture dans un même milieu sans vitamines et ensuite de cette culture dans un troisième. Si la croissance dans la troisième culture sans vitamines était encore la même, on pouvait conclure qu'il s'agissait d'une souche possédant la capacité de synthétiser tous les facteurs de croissance.

Les résultats de cette expérience sont donnés dans la partie gauche du tableau IV. Il en ressort que l'assimilation d'azote minéral, propriété des *Arthrobacter* d'après Conn et Dimmick, a été réalisée par 106 des 112 souches du sol, par 24 des 46 souches du fromage et par les 15 souches de boue activée. Cependant 60 p. 100 environ de tous les *Arthrobacter* du sol exigèrent l'addition des vitamines, le plus souvent de biotine, mais quelquefois d'une autre vitamine.

Les souches du sol tourbeux étaient différentes de celles des sols sablonneux et argileux, 5 souches exigeant le mélange des vitamines et 3, en outre, l'azote sous forme organique. Les cultures isolées des sols nigériens étaient capables d'utiliser l'azote minéral, mais leur besoin vitaminique était différent de celui des souches hollandaises.

Les souches du lait et 22 des 46 souches du fromage exigèrent l'azote organique. Les besoins vitaminiques de ce groupe étaient différents de ceux de la plupart des *Arthrobacter* du sol. Les cultures isolées de l'eau résiduaire étaient capables d'assimiler l'azote minéral en présence de biotine. Les *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Mycobacterium* et *Brevibacterium linens* métabolisèrent l'azote sous forme inorganique en présence du mélange des vitamines. Les Corynébactéries phytopathogènes exigèrent cependant pour la plupart de l'azote sous forme d'acides aminés en présence du mélange vitaminique.

c) FORMATION DE POLYSACCHARIDES.

Les *Arthrobacter* du sol possèdent la capacité d'accumuler de grandes quantités de polysaccharides dans leurs cellules [24]. Nous avons observé ce phénomène dans des expériences en appareil de Warburg dans lesquelles nous ajoutâmes à des suspensions de bâton-

nets et de cocci d'*Arthrobacter globiformis* une solution de glucose. Les milieux liquides étaient tamponnés par des phosphates (concentration ultérieure 0,04 M) et ne contenaient pas d'autres corps nutritifs. Comme on peut le voir dans la figure 1, la quantité du glucose respiré n'était qu'environ 25 p. 100 de la quantité ajoutée.

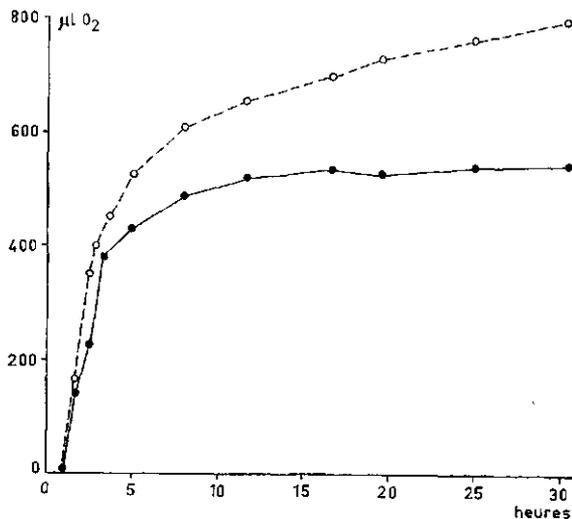


FIG. 1. — Absorption d'oxygène par des suspensions de bâtonnets et de cellules coccoïdes d'*A. globiformis*, souche 166, après addition de 2,9 mg de glucose. O₂ exigé pour la respiration quantitative du glucose : 2 200 µl. ●—● bâtonnets, ○—○ cellules coccoïdes.

La formation des acides organiques étant faible, nous avons supposé que la majeure partie du glucose avait été transformée en substances de réserve, protégées contre la dégradation des enzymes respiratoires. Notons que la partie du glucose respirée par les cellules coccoïdes était plus élevée que celle consommée par les bâtonnets.

Pour montrer qu'il s'agit d'une synthèse de polysaccharides, M. Zevenhuizen, dans notre laboratoire, a fait des analyses d'hydrates de carbone dans les cellules d'*Arthrobacter globiformis*, souche 1, avant et après le séjour dans l'appareil de Warburg. On a employé 1 ml d'une suspension bactérienne (3,59 mg de matière sèche, contenant 43,3 p. 100 d'hydrates de carbone) dans une solution contenant 0,1 p. 100 HPO₄K₂ et 0,25 p. 100 CO₃Ca, additionnée de 2 mg de glucose. On observa pendant une heure environ une absorption rapide d'oxygène, suivie par une respira-

tion à peu près au niveau du témoin (fig. 2). Quatre heures après l'addition du glucose, on termina l'expérience et dosa les polysaccharides dans les bactéries et dans la solution. A ce moment il n'y avait plus de glucose dans la solution.

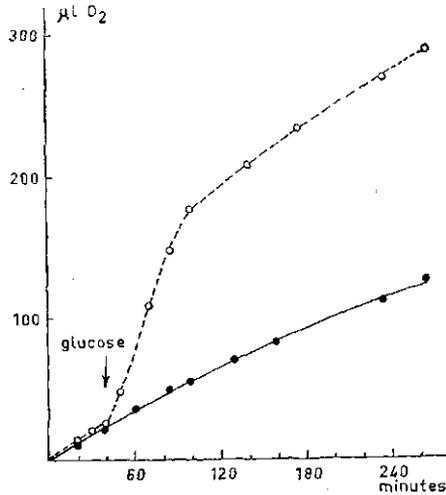


Fig. 2. — Absorption d'oxygène sans et après l'addition de 2,00 mg de glucose par fiole de Warburg. O₂ exigé pour la respiration totale du glucose : 1500 µl.
● — ● endogène, ○ — ○ avec glucose.

Les quantités de polysaccharides déterminés comme glucose trouvées étaient les suivantes :

	MG GLUCOSE	P. 100 DU GLUCOSE AJOUTÉ
Bactéries (au commencement de l'expérience)	1,52	
Bactéries + solution (après quatre heures)	2,57	
Polysaccharides synthétisés pendant l'expérience	1,05	52
Respiré (sans déduction du témoin)	0,39	20
Substances synthétisées inconnues (acides organiques, etc.)	0,56	28

Ces résultats nous montrent que, dans un milieu sans azote, les *Arthrobacter* sont capables de synthétiser rapidement, probablement pendant la première heure après l'addition de glucose, des quantités considérables de polysaccharides. Ces substances se trouvent partiellement dans les cellules, partiellement en dehors

des cellules. Ce dernier phénomène fut constaté aussi dans une expérience en appareil de Warburg, dans laquelle nous avons répété plusieurs fois l'addition de glucose. Après la cinquième addition, la suspension était visqueuse, grâce à la présence des substances muqueuses extracellulaires.

La formation des polysaccharides extracellulaires fut constatée aussi par M. Zevenhuizen dans une expérience en fioles d'Erlenmeyer agitées dans lesquelles on avait ajouté à une culture d'*Arthrobacter globiformis*, exempte d'azote, une solution de glucose. On dosa les hydrates de carbone intra- et extracellulaires, au commencement de l'expérience et après la consommation du glucose. Les résultats obtenus furent les suivants :

Hydrates de carbone
exprimés en mg de glucose p. 100 mg de matière bactérienne lavée sèche

	INTRA- CELLULAIRE	EXTRA- CELLULAIRE
Début de l'expérience	26,1	33,7
Fin de l'expérience	47,6	38,7

Comme le montrent les résultats de ces analyses, une proportion considérable des hydrates de carbone est extracellulaire.

d) PRODUCTION D'ACIDES AMINÉS PAR LES Arthrobacter.

Le D^r Veldkamp, dans notre laboratoire, a trouvé que certaines souches d'*Arthrobacter* du sol possèdent la capacité de former et d'excréter dans le milieu de culture des quantités considérables d'acides aminés, surtout d' α -alanine, et d'acide glutamique [34, 35]. Il s'agit de souches exigeant l'addition de biotine pour leur croissance en milieu nutritif minéral, avec l'azote sous forme ammoniacale et glucose comme corps carboné. En présence de cette vitamine en quantité insuffisante, on obtint une croissance limitée, dans laquelle les bactéries se présentent en formes coccoïdes. Dans ces conditions, on obtint une production considérable d'acide glutamique comme le montre la figure 3 (production maximale : 45 molécules d'acide glutamique par 100 molécules de glucose à une concentration de biotine de 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$). En augmentant la concentration de cette vitamine, la croissance des bactéries s'améliora, tandis que l'excrétion de l'acide glutamique diminuait. Une concentration de 10^{-3} μg de biotine par ml de solution nutritive donna une croissance maximale des bactéries sans excrétion d'acide glutamique.

Cette influence de la biotine sur la production d'acide glutamique par des bactéries avait déjà été constatée par Chao et Foster [6] chez une espèce de *Bacillus* et par Shiio et coll. [27].

Il est intéressant de signaler que le dernier auteur a travaillé avec une espèce de *Brevibacterium*, genre qui d'après nous est identique à, ou ressemble à, l'*Arthrobacter* du fromage. D'autres auteurs japonais ont décrit la production d'acide glutamique par *Micrococcus glutamicus*, microorganisme appartenant probablement au même groupe [17].

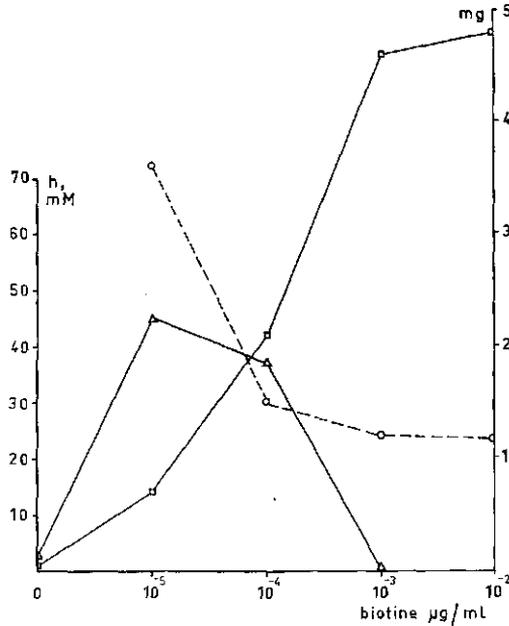


FIG. 3. — Effet de la biotine sur la croissance (poids sec, mg/ml), sur la production d'acide glutamique et sur le temps exigé pour la consommation du glucose par *Arthrobacter globiformis*, souche 23. Les cultures ont été analysées au moment où le glucose avait été consommé (voir Veldkamp [34, 35]). ○—○ temps (heures) pour consommation du glucose, □—□ poids sec des cellules (mg/ml), △—△ acide glutamique (mM/100 mM glucose consommé).

BACTÉRIOPHAGES

Partant d'un mélange de différents sols nous avons réussi à obtenir des bactériophages d'*Arthrobacter globiformis*. La méthode employée consista à ajouter à 100 g de sol un mélange de cultures liquides bactériennes (au total 90 ml) de douze souches d'*Arthrobacter*, cultivées pendant vingt-quatre heures dans un milieu contenant des sels inorganiques, extrait de levure et 0,3 p. 100 de glucose. Après une incubation de quarante-huit heures à 25° C, on filtra la suspension sur papier et ensuite sur bougies Chamberland

et on ajouta le filtrat (1 ml) à des tubes contenant 9 ml de la même solution nutritive, inoculée vingt-quatre heures auparavant avec les diverses souches d'*Arthrobacter*. Une deuxième série de cultures resta sans addition de filtrat. Après incubation de deux jours on observa un léger éclaircissement dans une des cultures (souche 4). La filtration de cette culture et l'addition de 1 ml du filtrat à de jeunes cultures de la même souche (quatre fois répétées) produisirent un éclaircissement complet dans les deux jours.

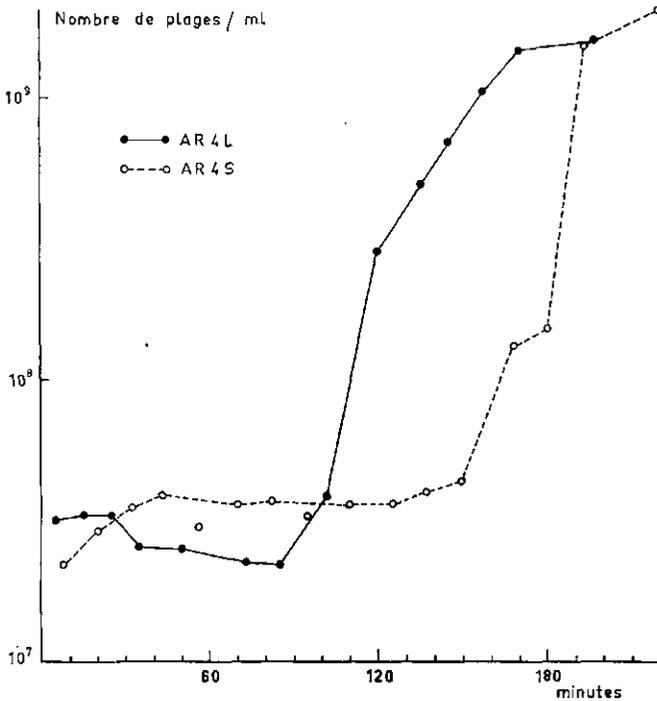


FIG. 4. — Temps de reproduction des bactériophages AR4L et AR4S.

Pour obtenir des plages nous avons ajouté 1 ml de filtrat à des boîtes de Petri et mélangé les phages avec la solution nutritive, citée plus haut, contenant 0,7 p. 100 de gélose Difco et additionnée d'une jeune culture d'*Arthrobacter*, souche 4. Pour dénombrer le nombre des particules phagiques nous avons ajouté 1 ml de filtrat à un tube contenant 9 ml de culture liquide bactérienne âgée de vingt-quatre heures et fait des dilutions dans des tubes semblables. 1 ml des diverses dilutions fut transféré dans des boîtes de Petri

et, après addition de gélose à environ 45° C et incubation pendant trois jours, on dénombra les plages. Les résultats d'une telle expérience sont montrés dans la figure 41, planche VII.

On voit que deux types de plages se présentent, les unes avec un diamètre d'environ 2 mm, les autres avec un diamètre d'environ 4 mm. Nous avons réussi à séparer les deux types (fig. 42 et 43). Outre la taille de leurs plages, les deux types sont caractérisés par des différences de leur temps de reproduction (fig. 4). Pour la détermination de celui-ci nous avons ajouté le produit de lyse des deux phages à des jeunes cultures d'*Arthrobacter*, souche 4, et nous avons compté le nombre des particules phagiques après différents laps de temps. Comme le montrent les résultats de cette expérience, il y eut une augmentation d'environ cinquante fois du nombre de phages après quatre-vingt-cinq (plage AR 4L) et cent cinquante minutes (phage AR 4S).

Des bactériophages pour des représentants du genre *Arthrobacter* ont été décrits par Conn et coll. [11] et par Gillespie [13]. Les premiers auteurs ont isolé 7 phages de différentes souches d'*Arthrobacter globiformis*. Ils ont tâché d'utiliser ces différents types de phages pour la classification de quelques bactéries du sol. Gillespie a obtenu des résultats ressemblants aux nôtres. Il a isolé 2 bactériophages, l'un produisant des plages de 0,5 mm, l'autre avec des plages de 1,5 mm. Le nombre de particules phagiques (5×10^9 - 8×10^9 par ml de lysat) trouvé par cet auteur est à peu près identique au nombre de nos lysats.

ÉCOLOGIE

a) PRÉSENCE DES *Arthrobacter* DANS DIVERS SOLS.

Nous avons déterminé le nombre d'*Arthrobacter* dans divers sols par la méthode de dilution et culture sur gélose à la caséine. Nous reconnaissons que les nombres des microorganismes établis de cette manière peuvent différer considérablement des nombres se trouvant dans le sol, parce que plusieurs organismes sont incapables de proliférer sur les milieux de laboratoire. Cependant les *Arthrobacter* appartiennent à ces organismes qui se développent excellentement sur les plaques de gélose à la caséine.

Les résultats de ces expériences sont donnés dans les tableaux V et VI. Il ressort de ces résultats que, dans les sols arables, les colonies d'*Arthrobacter* représentent environ 60 p. 100 (sols sablonneux) et dans le sol argileux jusqu'à 90 p. 100 de toutes les colonies bactériennes. Quoique dans le sol acide le nombre des bactéries fût plus bas, le pourcentage d'*Arthrobacter* était à peu près le même que celui des sols neutres ou alcalins. Dans le sol de la prairie permanente, le nombre de colonies d'*Arthrobacter* était beaucoup

plus bas et celui des bâtonnets plus élevé. La dessiccation des échantillons de sol a réduit le pourcentage d'*Arthrobacter* dans le sol de la prairie, mais a donné une petite augmentation dans le sol argileux. Notons que la contribution des Actinomycètes à la flore microbienne fut plus importante dans le sol de la prairie que dans celui du sol arable. Cette observation a été faite plusieurs fois.

TABLEAU V. — Nombre de microorganismes dans quelques sols sablonneux de différents pH.

pH	NOMBRE PAR GRAMME Sol frais (10^6)			NOMBRE DE SOUCHES BACTÉ- RIENNES TESTÉES	POURCENTAGE		
	Cham- pignons	Actino- mycètes	Bacté- ries		<i>Arthro- bacter</i>	Ba- cilles	Autres bâton- nets
5,0	0,11	0,32	1,3	23	61,0	26,0	13,0
5,5		5,6	7,4	26	57,7	42,3	
7,0	0,02	0,74	7,6	22	63,6	22,7	13,7

TABLEAU VI. — Nombre de microorganismes dans sol de prairie et sol arable avant et après dessiccation.

Sol	pH	Hu- mi- dité	NOMBRE PAR GRAMME sol sec (10^6)			NOM- BRE DE SOU- CHES BACTÉ- RIEN- NES TES- TÉES	POURCENTAGE		
			Cham- pi- gnons	Acti- no- my- cètes	Bacté- ries		<i>Arthro- bacter</i>	Ba- cilles	Autres bâton- nets
De prairie	5,2	15,8	2,5	44	61	65	43,0	14,0	43,0
		1,0		6,0	17	119	18,5	18,5	63,0
Arable (argi- leux)	7,9	20,5	3,6	11	70	130	75,0	14,0	11,0
		2,1	4,3	6,7	60	80	88,5	9,0	2,5

PLANCHE VII

FIG. 41. — Diverses dilutions d'un mélange de deux bactériophages sur *Arthrobacter globiformis* souche 4.

FIG. 42. — Plages d'AR4L.

FIG. 43. — Plages d'AR4S.

41



42



43

PLANCHE VII.

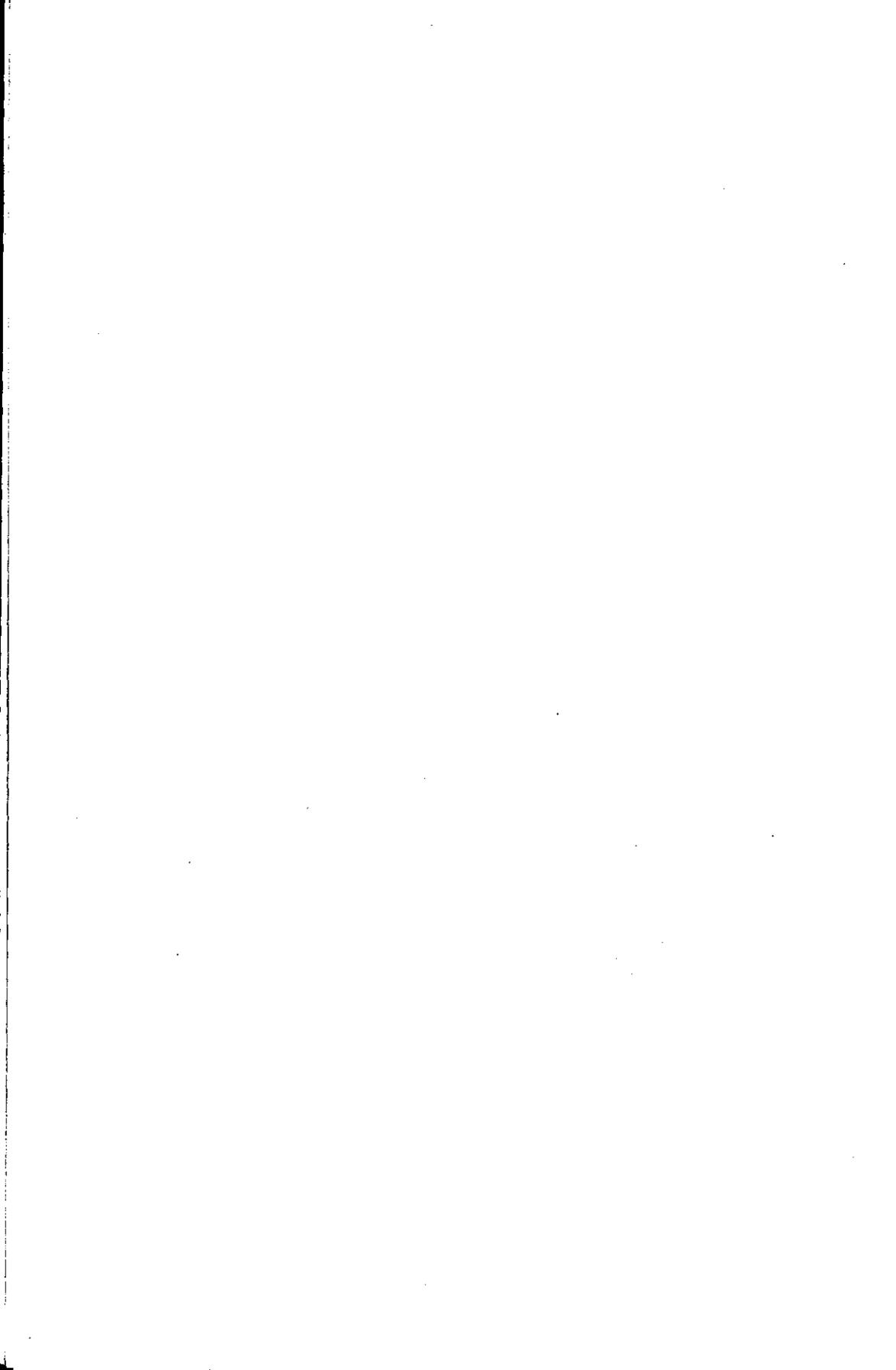


TABLEAU VII. — Nombre de microorganismes dans quelques sols nigériens.

Sol	pH	HUMI- DITÉ %	NOMBRE PAR GRAMME SOL SEC	NOMBRE DE SOUCHES TESTÉES	POURCENTAGES				
					<i>Arthro- bacter</i>	Bacilles	Autres bâtonnets	Cham- pignons	Actino- mycètes
Argile sablonneux	7,4	1,5	1,1 × 10 ⁷	105	58,1	3,8	7,6	1,0	29,5
Argile sablonneux	5,8	1,6	8,1 × 10 ⁶	55	18,2	47,3	1,8	1,8	30,9
Argileux	4,2	1,8	3,2 × 10 ⁶	41	2,4	56,1	0,0	0,0	41,5
Argile tourbeux	4,8	12,2	1,8 × 10 ⁶	86	30,2	12,8	15,1	5,8	36,0
Argile sablonneux	4,5	5,3	1,7 × 10 ⁶	18	5,5	50,0	11,0	0,0	33,0
Argileux	3,8	1,0	1,9 × 10 ⁶	24	4,1	54,2	16,7	0,0	25,0
Sablonneux	4,8	1,0	1,9 × 10 ⁶	81	3,7	91,4	0,0	1,2	3,7
Argileux	6,7	1,6	1,4 × 10 ⁶	48	0,0	70,8	0,0	2,1	27,1
Argile sablonneux	5,9	1,2	2,7 × 10 ⁶	38	21,0	63,2	0,0	2,6	13,2
Argile sablonneux	5,4	11,1	1,5 × 10 ⁷	68	5,9	77,9	7,4	0,0	8,8

Les sols tropicaux, prélevés et conservés en général en condition sèche, contenaient des nombres variables d'*Arthrobacter*. Dans la plupart des sols les pourcentages de ces bactéries étaient plus bas, tandis que ceux des bacilles étaient plus élevés que les pourcentages des sols hollandais, phénomène indiquant que ces sols avaient été exposés à des conditions de dessiccation persistante (voir tableau VII).

b) EFFET DE LA DESSICCATION DU SOL SUR LE NOMBRE DES *Arthrobacter*.

Pour étudier la résistance des *Arthrobacter* vis-à-vis de la dessiccation du sol, nous avons placé des échantillons de quelques sols sablonneux dans des boîtes Petri stériles et nous les avons incubés, séchés à l'air, pendant trente-cinq mois à une température de 25° C. Les sols avaient été gardés en vases dans les conditions d'humidité et de température constante pendant quelques années avant le commencement de l'expérience. Quelques sols avaient été additionnés d'une certaine quantité de farine de racines de plantes légumineuses pendant cette période.

Nous avons compté le nombre des colonies des *Arthrobacter*, des bacilles et des autres bactéries, sur plaques de gélose à la caséine, au commencement de l'expérience et après deux, dix et trente-cinq mois d'incubation. Les résultats de cette expérience, donnés dans le tableau VIII, montrent que les *Arthrobacter* sont capables de survivre pendant une période de plus de dix mois en terre sèche. Après trois ans d'incubation, cependant, seuls les bacilles donnent des colonies.

c) RÉSISTANCE DES CELLULES EN BATONNETS ET COCCOÏDES A DES TEMPÉRATURES ÉLEVÉES.

Pour savoir si les deux types morphologiques d'*Arthrobacter* possèdent une thermostabilité différente, nous avons exposé cocci et bâtonnets d'*Arthrobacter globiformis* (souche 1), pendant une période de cinq minutes, à différentes températures (45, 50, 55, 60 et 65° C). Les cocci étaient obtenus par culture sur gélose à la caséine pendant quatre semaines, les bâtonnets par culture sur gélose à l'extrait de levure 0,7 p. 100 et glucose 2 p. 100 pendant deux jours. Après traitement, le nombre des cellules vivantes fut déterminé par ensemencement sur gélose à l'extrait de levure et glucose. Comme le montrent les résultats de cette expérience (tableau IX), les cellules coccoïdes ont une thermostabilité plus grande que celle des bâtonnets. Cette observation est en bonne harmonie avec l'hypothèse que les cellules coccoïdes ont une résistance aux conditions défavorables plus élevée que celle des bâtonnets. Cependant cette résistance est beaucoup moins importante que celle des endospores.

TABLEAU VIII. — Influence de la dessiccation du sol sur le nombre des *Arthrobacter*.

SOL	pH	TEMPS DE DESSICCATION (mois)	HUMIDITÉ %	NOMBRE PAR GRAMME SOL SEC				NOMBRE DE SOUCHES BACTÉRIENNES TESTÉES	POURCENTAGES		
				Champignons (10 ⁵)	Actino-mycètes (10 ⁴)	Bactéries (10 ⁶)	<i>Arthro-bacter</i>		Bacilles	Autres bâtonnets	
Sablonneux	7,0	0	16,0	0	3,4	3,3	18	50,0	38,9	11,1	
		2	0,5	0	0,35	2,0	39	51,3	46,1	2,6	
		10	0,5	0	0,28	0,56	19	31,6	68,4	0	
		35	0,5	0	0,20	0,56	60	0	100,0	0	
Sablonneux	7,0	0	13,3	0	3,6	4,0	19	36,8	57,9	5,3	
		2	0,5	0	0,79	3,8	37	62,2	37,8	0	
		35	0,5	0	0,23	1,0	55	0	100,0	0	
Sablonneux	7,0	0	13,8	0,37	14	12	16	56,3	37,5	6,2	
		2	0,5	0	0,80	2,3	39	43,6	53,8	2,6	
		10	0,5	0	1,1	2,8	50	58,0	42,0	0	
		35	0,5	0	1,0	1,8	61	0	100,0	0	
Sablonneux	7,0	0	19,2	3,6	21	17	14	50,0	42,9	7,1	
		2	0,5	0	0,83	5,8	39	35,9	64,1	0	
		35	0,5	0	0,31	2,7	32	0	100,0	0	

TABLEAU IX. — Thermostabilité de cellules coccoïdes et en bâtonnets d'*Arthrobacter globiformis*.

TEMPÉRATURE (°C), 5 MINUTES	NOMBRE DE CELLULES PAR ML. (10 ⁶)	
	Cocci	Bâtonnets
Témoin	186	111
45	95	25
50	16	0
55	0	0
60	0	0
65	0	0

d) FONCTIONS DES *Arthrobacter* DANS LA NATURE.

L'observation que les *Arthrobacter* peuvent être isolés en grand nombre des sols sablonneux, acides et calcaires, tourbeux et argileux des régions tempérées (Hollande), de même que tropicales (Nigéria), et aussi des eaux résiduaires (boue activée) montre, d'après nous, que ce groupement de bactéries joue un rôle important dans la nature. Le fait que ces organismes peuvent proliférer lentement sous forme de coccoïdes, dans des conditions défavorables, et rapidement sous forme de bâtonnets dans des conditions favorables, leur permet de prendre part à la flore autochtone de même qu'à la flore zymogène.

Une autre propriété de ces organismes, qui probablement se révélera de grande valeur pour la dégradation microbienne des débris des plantes et des animaux dans la nature, est la capacité de certaines souches de décomposer des substances difficilement attaquables, comme la cellulose, la lignine, les combinaisons à noyaux benzéniques, comme les phénols, herbicides [1, 2, 15], etc. Jusqu'ici nous ne savons pas s'il s'agit de la présence dans le sol de souches capables de métaboliser des substances phénoliques, ou de mutations qui sont sélectionnées après l'addition des herbicides. Notons, par exemple, les recherches de Audus [1, 2] et de Jensen et Gundersen [15], qui observèrent la décomposition des herbicides par microorganismes du type *Arthrobacter*, qui se développèrent après une période d'incubation prolongée.

M. Wieringa, dans notre laboratoire, a constaté le développement d'une flore d'*Arthrobacter* capable de décomposer des substances phénoliques après addition à un sol tourbeux, et incubation d'environ trois semaines, d'une certaine quantité de toluène, dans le but de stériliser le sol. Autre exemple : au cours d'une recherche sur la dégradation des substances phénoliques par une boue activée,

M. van der Struik, dans notre laboratoire, en augmentant lentement la concentration de phénol dans l'eau résiduaire jusqu'à 500 mg par litre, observa le développement d'une flore capable de métaboliser le phénol, et constituée surtout par des *Arthrobacter*.

Rappelons, pour conclure, que les Mycobactéries du sol (*M. phlei*), organismes qui sont identiques ou proches parents des *Arthrobacter*, sont capables de décomposer des hydrocarbures.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Conn et Dimmick en 1947 [12] ont donné le nom d'*Arthrobacter globiformis* aux bactéries du sol isolées pour la première fois par Conn en 1928 et décrites par lui comme *Bacterium globiformis*. Ces organismes pléomorphes, dont les formes jeunes sont des bâtonnets irréguliers, se transforment par vieillissement en cellules coccoides. Elles sont décrites par Jensen [14] en 1934 comme Corynébactéries du sol et par Krassilnikow [18] comme Mycobactéries. Il s'agit d'un groupe d'organismes alliés à ces deux familles de bactéries et aux *Nocardia*, organismes formant un mycélium fragile et dont les colonies sont moins pâteuses que celles des *Arthrobacter*.

D'après Conn et Dimmick, les *Arthrobacter* sont différents des Corynébactéries animales qui ne possèdent pas le cycle coccus-bâtonnet-coccus, qui sont Gram + et exigent l'azote sous forme organique (voir aussi Clark [9]). Les Mycobactéries sont différentes à cause de leur acido-résistance. L'exposé de Jensen montre cependant qu'il existe dans le sol des formes intermédiaires entre les Corynébactéries du sol (les *Arthrobacter*), les Mycobactéries et les *Nocardia*.

Si on admet que les *Arthrobacter* sont des bactéries aérobies, pléomorphes, avec cellules jeunes sous forme de bâtonnets, quelquefois filamenteuses et ramifiées, se transformant en cellules coccoides, il est évident que la présence de ce groupe de bactéries n'est pas limitée aux sols. M. Adamse, dans notre laboratoire, a constaté que de telles bactéries se trouvent fréquemment dans les boues activées. En outre, on les a trouvées en grand nombre dans certains fromages (pâtes molles). Pour savoir si les organismes isolés des diverses sources possèdent les mêmes caractères, nous avons réalisé une investigation détaillée dans laquelle nous avons comparé un certain nombre de caractères physiologiques. Un résumé de ces expériences se trouve dans le tableau IV.

Il ressort de ce tableau que la plupart des *Arthrobacter* isolés des sols sablonneux et argileux étaient capables d'utiliser l'azote minéral. Plus de 50 p. 100 de ces souches exigèrent cependant

l'addition de biotine. Si nous comparons les autres caractères des groupes, sans et avec besoin de biotine, nous constatons qu'ils sont à peu près les mêmes (Gram-négatif ou variable, utilisation de saccharose, lactose, glycérine, amidon, activité protéolytique). Il s'agit apparemment de souches très voisines.

Les cultures isolées du sol tourbeux étaient différentes de celles des sols sablonneux et argileux. Des 10 souches, 5 exigèrent le mélange des vitamines, 3 en outre l'azote sous forme organique. Celles-ci étaient Gram + et protéolytiques, les autres souches étaient pour la plupart Gram-négatives ou Gram-variables et non protéolytiques. La capacité de décomposer les 4 corps hydrocarbonés, surtout l'amidon, était très faiblement représentée.

Les souches du sol de prairie ressemblèrent à celles des autres sols hollandais, mais une plus grande partie des souches était Gram + et la capacité de décomposer l'amidon était presque nulle chez toutes les souches.

Les souches de la boue activée normale montrèrent une ressemblance très grande avec les *Arthrobacter* du sol. Elles exigèrent de la biotine, furent Gram-variables ou Gram-négatives et furent capables de décomposer les quatre corps hydrocarbonés et la gélatine. Les 5 souches à activité phénololytique étaient différentes des autres souches de la boue activée; elles n'exigèrent pas de biotine et montrèrent une réaction de Gram positive. Ces caractères étaient identiques à ceux de *Mycobacterium phlei*.

Les souches isolées du lait et du fromage « Meshanger » différencèrent considérablement des *Arthrobacter* du sol. Environ 50 p. 100 des souches du fromage étaient capables de proliférer sur azote minéral. Cependant une grande partie de ces souches exigèrent le mélange des vitamines. En général la capacité de décomposer les quatre composés hydrocarbonés était absente. Il est très remarquable que le groupe des *Arthrobacter* du fromage exigeant des acides aminés, sans vitamines, était capable de métaboliser le lactose et l'amidon et liquéfia la gélatine. La plupart des organismes des autres groupes ne décomposèrent pas ces trois substances. La réaction de Gram était positive chez presque 70 p. 100 des souches; indépendamment des besoins azotés ou vitaminiques. Il s'agit donc d'un groupe d'organismes morphologiquement identiques aux *Arthrobacter* du sol, mais différents relativement à la réaction de Gram, la protéolyse, et la décomposition des quatre corps hydrocarbonés. Ces organismes sont probablement identiques aux bactéries du type *Brevibacterium linens*.

Nos recherches morphologiques ont montré qu'il existait au moins deux modes de transformation des cellules en bâtonnets ou filamenteuses en cocci : raccourcissement graduel des cellules proliférantes et désintégration subite des cellules longues par

formation en même temps d'un certain nombre de cloisonnements transversaux. Le type d'organisme, mais surtout la composition du milieu nutritif et, probablement, quelques autres facteurs, inconnus encore, influencent ces phénomènes. Dans des conditions minimales de développement les bâtonnets, formés après la germination des cellules coccoïdes, restent très courts et ils se transforment en cocci après un petit nombre de divisions. En milieu riche, par contre, on constata la formation de cellules plus larges et plus longues, irrégulières, avec des gonflements et quelquefois ramifiées. En vieillissant, ces cellules se transforment en cellules ovales ou rondes, de diamètre variable, mais en général d'une largeur considérablement plus élevée que celle des cocci sur milieu minimal. Quelquefois les cellules restent sous forme filamenteuse.

Il est très probable que dans le sol et dans la boue activée, où les conditions pour la prolifération des microorganismes en général sont limitées, les *Arthrobacter* se trouvent sous forme de cellules coccoïdes ou ovales. Taylor [32], qui a étudié le développement de 4 souches d'*Arthrobacter globiformis* en sol stérilisé, rapporte qu'il a constaté une prolifération sous forme de cellules coccoïdes allongées.

Le fait que les *Arthrobacter* ont été trouvés en grand nombre dans divers sols hollandais et nigériens et dans des sols américains [10] et canadiens [32] montre l'importance de ce groupe de microorganismes dans les sols. Pour expliquer cette grande propagation il faut tenir compte de la résistance de ces organismes à la dessiccation. La plupart des cellules coccoïdes sont apparemment capables de survivre à un séjour de plus de dix mois en sol séché à l'air. Après réhumidification d'un tel sol une germination rapide des cellules coccoïdes aura lieu, suivie par une prolifération normale.

Le groupe des *Arthrobacter* est caractérisé par la capacité de certains de ses représentants de réaliser des activités spécifiques (décomposition de la cellulose, lignine, substances phénoliques comme les herbicides, etc., formation de grandes quantités de polysaccharides intra- et extracellulaires, excrétion d'acides aminés, etc.). Ces caractères sont sans doute d'une grande valeur pour la microbiologie du sol.

RÉSUMÉ

Nous avons isolé environ 150 souches d'*Arthrobacter* de différents sols hollandais et nigériens (sablonneux, argileux, tourbeux, de prairie), de la boue activée (eaux résiduaires), du lait et du fromage « Meshanger » (pâtes molles). Nous avons étudié la morphologie et la physiologie de ces souches et les avons comparées à des

cultures de *Mycobacterium phlei*, *Cellulomonas* et *Brevibacterium linens*. Morphologiquement les *Arthrobacter* des différentes sources sont à peu près identiques et ils sont très similaires aux représentants de *Mycobacterium*, *Cellulomonas* et *Brevibacterium*. Physiologiquement on a constaté des différences entre les divers groupes. La plupart des *Arthrobacter* isolés des sols montrèrent une réaction de Gram-négative ou variable des cellules jeunes, furent capables d'utiliser l'azote minéral, furent protéolytiques et métabolisèrent un grand nombre de corps carbonés. Environ 60 p. 100 d'eux exigèrent l'addition de vitamines, le plus souvent de la biotine. La physiologie des *Arthrobacter* isolés de la boue activée fut très proche de celle des *Arthrobacter* du sol. Les cultures isolées du fromage furent Gram-positives ou Gram-variables. Une partie des souches utilisa l'azote minéral, une autre partie exigea l'azote sous forme organique. Les besoins vitaminiques d'un certain nombre de ces cultures furent différents de ceux des *Arthrobacter* du sol. Leur capacité de métaboliser des corps carbonés fut faible.

Certaines souches d'*Arthrobacter* sont capables, partant de glucose, de produire de grandes quantités de polysaccharides intra- et extracellulaires; d'autres souches peuvent excréter des quantités considérables d'acides aminés, surtout d'acide glutamique.

Nous pensons que les *Arthrobacter* sont de grande valeur pour la microbiologie du sol. Ils sont trouvés en grand nombre dans la plupart des sols étudiés. Des représentants de ce groupe sont capables de décomposer la cellulose, la lignine et les substances phénoliques, comme les herbicides.

SUMMARY

MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY AND ECOLOGY OF *Arthrobacter*

Approximately 150 strains of *Arthrobacter* have been isolated from different Dutch and Nigerian soils (sandy, peaty and clay soils and permanent pasture), furthermore from activated sludge and from milk and "Meshanger" cheese. The morphology and the physiology of these strains were studied and compared with those of *Mycobacterium phlei*, *Cellulomonas* and *Brevibacterium linens*. Morphologically the *Arthrobacter* cultures isolated from different sources were found to be very similar and they resembled very much the *Mycobacterium*, *Cellulomonas* and *Brevibacterium* species. Physiologically they showed a number of differences: soil *Arthrobacters* were mostly found to be Gram-negative or Gram-variable in a young stage; they were able to use inorganic nitrogen compounds, to attack gelatin and to use a variety of carbon compounds. About 60 p. 100 of all the strains from soil required

vitamins, mostly biotin only. The strains isolated from activated sludge were very similar to those from soil. Cultures isolated from cheese were Gram-positive or Gram-variable. Some of them were able to assimilate inorganic nitrogen compounds, others required amino acids. The vitamin requirement of at least part of the strains was different from that of the soil Arthrobacters and the same was true of the decomposition of carbon compounds.

Some *Arthrobacter* strains are able to produce large amounts of intra- and extracellular polysaccharides; other strains produce amino acids, particularly glutamic acid.

Arthrobacters are thought to be of great importance in soil microbiology. They occurred in large numbers in almost every soil tested. Strains of this group are able to decompose cellulose, lignin and phenolic compounds like herbicides.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUDUS (L. J.). *Plant and Soil*, 1949, 2, 31.
- [2] AUDUS (L. J.). *Plant and Soil*, 1951, 3, 170.
- [3] BERGEY. *Manual of determinative bacteriology*, 1957.
- [4] BLANKENSHIP (L. C.) and DOETSCH (R. N.). *J. Bact.*, 1961, 82, 882.
- [5] CHAN (E. C. S.) and STEVENSON (I. L.). *Canad. J. Microb.*, 1962, 8, 403.
- [6] CHAO (K. C.) and FOSTER (J. W.). *J. Bact.*, 1959, 77, 715.
- [7] CHAPLIN (C. E.). *Canad. J. Microb.*, 1957, 3, 103.
- [8] CHAPLIN (C. E.) and LOCHHEAD (A. G.). *Canad. J. Microb.*, 1956, 2, 340.
- [9] CLARK (F. E.). *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. and Taxon.*, 1952, 2, 45.
- [10] CONN (H. J.). *N.Y. State agr. exp. Sta. tech. Bull.*, 1928, 138.
- [11] CONN (H. J.), BOTTCHEER (E. J.) and RANDALL (C.). *Canad. J. Bact.*, 1945, 49, 359.
- [12] CONN (H. J.) and DIMMICK (I.). *J. Bact.*, 1947, 54, 291.
- [13] GILLESPIE (D. C.). *Canad. J. Microb.*, 1960, 6, 477.
- [14] JENSEN (H. L.). *Proc. Linn. Soc. New South Wales*, 1934, 59, 19.
- [15] JENSEN (H. L.) and GUNDERSEN (K.). *Acta agr. scand.*, 1956, 6, 1.
- [16] JENSEN (V.) et FELUMB (G.). *Kong. veter. Landbohøjskole Arsskr.*, 1962, 195.
- [17] KINOSHITA (S.). *Adv. appl. Microb.*, 1959, 1, 201.
- [18] KRASSILNIKOW (N. A.). *Zbl. Bakt.*, II, 1934, 90, 428.
- [19] KUHN (D. A.) und STARR (M. P.). *Arch. Mikrob.*, 1960, 36, 175.
- [20] LOCHHEAD (A. G.). *Arch. Mikrob.*, 1958, 31, 163.
- [21] LOCHHEAD (A. G.) and BURTON (M. O.). *Canad. J. Bot.*, 1953, 51, 7.
- [22] LOCHHEAD (A. G.) and BURTON (M. O.). *Canad. J. Microb.*, 1954-1955, 1, 319.
- [23] MORRIS (J. G.). *J. gen. Microbiol.*, 1960, 22, 564.
- [24] MULDER (E. G.), DEINEMA (M. H.), VAN VEEN (W. L.) et ZEVENHUIZEN (L. P. T. M.). *Rec. Trav. Chim.*, 1962, 81, 797.
- [25] MÜLLER (J.). *Arch. Mikrob.*, 1957, 27, 105.
- [26] SACKS (L. E.). *J. Bact.*, 1954, 67, 342.

- [27] SHIHO (I.), OTSUKA (S. I.) et TAKAHASHI (M.). *J. Biochem. Tokyo*, 1962, 51, 56.
- [28] STARR (M. P.) et KUHN (D. A.). *Arch. Mikrob.*, 1962, 42, 289.
- [29] STEVENSON (I. L.). *Canad. J. Microb.*, 1961, 7, 569.
- [30] STEVENSON (I. L.). *Canad. J. Microb.*, 1962, 8, 655.
- [31] SUNDMAN (V.). *Canad. J. Microb.*, 1958, 4, 221.
- [32] TAYLOR (C. B.). *Soil Sci.*, 1938, 46, 307.
- [33] TOPPING (L. E.). *Zbl. Bakt., II*, 1937, 97, 289.
- [34] VELDKAMP (H.). *Abstr. VIIIth intern. Congr. Microbiol.*, 1962.
- [35] VELDKAMP (H.), v. d. BERG (G.) et ZEVENHUIZEN (L. P. T. M.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1963, 29, 35.
- [36] ZAGALLO (A. C.) and WANG (C. H.). *J. gen. Microbiol.*, 1962, 29, 389.
-