Essai sur une étude au microscope électronique de la microflore des sédiments argileux de cavernes

(A preliminary study using an electron microscope, on the microflora of cave clay sediments)

Par V. CAUMARTIN¹⁾

Avec planches 1 (1)–5 (5)

Cet essai n'a pas l'ambition d'introduire une discussion sur l'originalité et le rôle des peuplements des sédiments argileux de caverne mais, seulement, de montrer que ceux-ci peuvent être soumis avec succès à un examen direct.

Une technique écologique de mise en culture ne pouvait à elle seule décider de la nature des peuplements microscopiques de cavernes car ses résultats ne cadrent pas toujours avec l'analyse chimique. Les apports de surface, véhiculés par l'eau, se déposent en effet, accompagnés des microorganismes qui assurent leur transformation biochimique, résistent un certain temps aux conditions de milieu, sous forme de spores ou de kystes, puis disparaissent si les apports ne sont pas renouvelés. La présence d'éléments actifs temporaires et d'éléments actifs résiduels et permanents est une réalité dont il faut tenir compte. Il importait donc de rechercher les microorganismes en place, de façon permanente, sur des biotopes aussi bien protégés que possible, puis, d'essayer de les cultiver, pour obtenir les premiers éléments d'une étude correcte. A partir d'un prélèvement argileux, une séparation par filtration est possible, une séparation par mousse est beaucoup plus efficace.

Nous donnerons un aperçu des premiers résultats obtenus par une technique de mousse. Ils sont encourageants car ils nous mettent en présence d'un ensemble d'allure homogène dans lequel on peut distinguer une fraction autochtone et une fraction allochtone. Mais il est bien évident que seule, une étude de longue haleine, portant sur un ensemble géographique beaucoup plus vaste, résoudra les problèmes posés sur le plan systématique ou biologique.

¹⁾ Laboratoire Souterrain du C.N.R.S. – Moulis (Ariège), France.

Considérations sur les biotopes étudiés

Les sédiments de grottes constituent un biotope particulier dont il importe tout d'abord de préciser les caractères. Nous les trouvons en place dans une cavité dont l'atmosphère est à saturation d'humidité, le plus souvent à sursaturation, ils se trouvent donc eux-mêmes, du fait des échanges qu'ils entretiennent de façon continue, à saturation. Les réseaux souterrains plus ou moins secs sont directement en contact avec l'extérieur et sont de ce fait pour nous dépourvus d'intérêt. La température ambiante varie peu au cours des saisons; des écarts saisonniers de 4 à 5° d'amplitude sont un maximum et nous relevons des moyennes annuelles variables, suivant l'altitude, de 6 à 15° dans les Pyrénées françaises, de 10 à 14° dans les Cévennes et 11 à 13° dans les Causses (1); la plupart des cavernes que nous avons prospectées à moyenne et basse altitude présentaient une température moyenne de 10 à 11°, avec des écarts saisonniers de 2° au maximum. Ces conditions climatiques exceptionnelles, typiquement souterraines, ont pour corollaire une remarquable continuité des développements microbiens lorsque, par ailleurs, la composition physico-chimique du milieu s'y prête.

Les sédiments prospectés – nous avons éliminé les éboulis rocheux et les sédiments détritiques grossiers – contenaient 0 à 30% d'une fraction en majeure partie argileuse (fraction inférieure à 1 micron) et 0 à 80% d'une fraction limoneuse comprise entre 1 micron et 20 microns (5). L'étude aux rayons X de la fraction inférieure à 1 micron fait apparaître, à côté des débris de calcite et de quartz, une proportion d'Illite importante, souvent 30%, parfois 50%; la Montmorillonite et l'Halloysite y figurent rarement et seulement pour quelques % (2). Le support dont nous avons étudié les peuplements est donc constitué par des fractions limoneuse et argileuse illitique importantes.

Ces biotopes sont régulièrement enrichis par des solutions minérales qui proviennent des horizons pédologiques, percolent à travers des voûtes calcaire, grâce à leur réseau de fentes, et, contribuent à maintenir un taux de carbonates (sous la forme essentiellement de carbonate de calcium) qui n'est qu'exceptionnellement inférieur à 10% et pratiquement jamais nul, et, à mettre en place des sulfates, des chlorures, des phosphates, des oligoéléments, etc... Ils peuvent en outre périodiquement prendre contact, par l'intermédiaire des pertes et des infiltrations de toutes sortes, avec les ruissellements qui transportent la matière organique arrachée à la couverture végétale. La fraction colloïdale argileuse contribue à maintenir en place, outre les éléments chimiques, une teinture organique qui n'atteint que rarement 1%,

est toujours pratiquement inférieure à 0,5 %, avec une moyenne de 0,15 à 0,30 %; dans un sédiment superficiel, la quantité de matière organique oscille approximativement entre 1 et 10 %. Le rapport C/N varie entre 2,5 et 4,5 quand les sédiments, après une période de submersion, sont accessibles, alors qu'en surface le rapport admis varie entre 10 et 12. Ces conditions physico-chimiques sont favorables, malgré la faible teneur organique, au maintien et au développement des microorganismes.

Nous nous limiterons ici aux microorganismes de taille inférieure à celle des bactéries courantes; ils se signalent d'emblée à notre attention par leur forme générale en fuseau; nous les avons systématiquement recherchés au microscope électronique; précisons qu'ils ne représentent pas, à beaucoup près, la totalité des peuplements microbiens des sédiments souterrains mais seulement la fraction microscopique la plus fine et la plus originale.

Techniques d'étude

Ces organismes ne peuvent être isolés que par une technique de mousse appropriée. Un prélèvement d'argile est mis en suspension dans l'eau distillée additionnée d'une solution de savon de Marseille filtrée et soumis à l'agitation mécanique, dans une enceinte close, pour éviter l'apport des particules étrangères. La quantité de savon utilisée, pour obtenir une mousse persistante, est bien entendu fonction de la teneur en sels minéraux solubles de la suspension; elle est déterminée au préalable. La mousse entraîne en surface les particules légères; elle est recueillie à l'aide d'une pipette Pasteur, dans l'eau distillée. Après décantation et disparition de la mousse, la phase liquide contient des cristaux minéraux, des particules colloïdales et, libérés de leur gangue, les microorganismes recherchés; elle est diluée dans des proportions variant de 1 pour 100 à 1 pour 1.000, additionnée, sur une prise de 10 cc environ, d'une goutte de Twen 80 pour obtenir une bonne dispersion, étalée sur un film de Formvar et examinée au Microscope électronique. Les grossissements utilisés pour une étude correcte varient à partir de 5.000.

Nous insistons sur le fait que seuls ont été utilisés des solutions et des récipients stérilisés. En outre, chaque examen d'argile a été accompagné, à titre de contrôle, d'un témoin obtenu en répétant sur l'eau distillée toutes les opérations que nous venons de décrire.

Un certain nombre d'éléments examinés ont pu être cultivés. Le milieu utilisé contenait, par litre, 0,10 gr de phosphate bipotassique, 1,5 gr de sulfate de magnésium, 0,05 gr de chlorure de sodium, 3,30 gr

de chlorure de potassium, 2 gr de carbonate de calcium, 1,60 gr de carbonate de magnésium et 1 gr de sulfate ferreux filtré au $\frac{1}{10}$ de mu de porosité et ajouté seulement au moment de l'ensemencement, et, pour la partie organique, 50 cc d'extrait clair de haricots obtenu en traitant à l'ébullition, jusqu'à cuisson, des haricots secs par un poids égal d'eau distillée, puis en filtrant. Le développement est nettement favorisé par l'apport d'un certain nombre d'oligoéléments: Fe^{+++} (chlorure), Al^{+++} (sulfate), Br^- (bromure de potassium), à la concentration de 10^{-5} ions-grammes litre, Ni^{++} (chlorure), Cu^{++} (sulfate), Li^+ (chlorure), BO_3^{---} (Borate de potassium), MoO_4^{--} (Molybdate de sodium), à la concentration de 10^{-6} ions-grammes litre, Co^{++} (nitrates), à la concentration de 10^{-7} ions-grammes litre, Mn^{++} (chlorure), Zn^+ (sulfate), TiO_2 (oxyde), à la concentration de 10^{-8} ions-grammes litre, I^- (iodure de potassium), à la concentration de 10^{-9} ions-grammes litre. Mais il est plus expéditif de préparer, suivant la technique en usage dans l'étude des sols (3), un extrait du sédiment souterrain à étudier et de remplacer l'eau distillée de préparation du milieu, par cet extrait; on obtient, par ce procédé, une action oligodynamique souvent supérieure.

Les manipulations sont plus aisées à partir de cultures en milieu liquide. Il faut parvenir à une souche pratiquement pure pour ne pas être gêné dans l'observation; le fait que les sédiments souterrains soient beaucoup moins riches quantitativement et qualitativement que les sédiments de surface et que nous procédions d'abord à l'examen des milieux naturels, nous permet d'atteindre plus aisément ce but. Des dilutions de 1 pour 1, 1 pour 10, 1 pour 50, 100, 500, 1.000, 10.000 à partir d'une suspension poids pour poids dans l'eau distillée stérile, d'un sédiment choisi en raison de la relative pureté de son peuplement, sont mises en place dans une série de tubes à essais contenant 10 cc de milieu stérilisé, bouchés au coton et étuvés. La durée d'incubation est de 10 jours à 1 mois à la température de 28° . Les milieux, au départ, après décantation des carbonates, sont limpides; ils se troublent uniformément sans dégagement gazeux apparent, sans odeur particulière quand on a réalisé une culture pure. L'examen au microscope ordinaire permet d'éliminer les milieux contenant des bactéries banales; l'examen au microscope électronique permet d'achever la sélection. Nous avons rarement eu à recommencer une dilution.

Nous devons insister sur les formes obtenues en culture; si certains organismes restent semblables à eux-mêmes, au format près, d'autres acquièrent un ou deux prolongements filiformes. L'ensemble – cultivable ou non – possède une forte sensibilité aux décharges électroniques

lorsqu'on observe aux forts grossissements, sous des tensions de 60.000 à 80.000 volts; nous avons souvent utilisé ce critère, dans l'étude des milieux naturels, pour opérer une première sélection, en présence de dépôts minéraux gênants. La plupart présentent en outre, dans les sédiments, des bourgeonnements qui semblent en rapport avec la faible valeur nutritive des biotopes.

Nature des germes étudiés

Précisons tout d'abord quelques-unes des directives utilisées pour faciliter l'inventaire.

Toutes les formes observées sont dérivées du fuseau, donc apparemment semblables mais nous avons pu les repérer en utilisant les détails morphologiques, les dimensions et, également, le rapport entre la longueur du grand axe et celle du petit axe (R), significatif de l'allure générale. On peut se trouver en effet en présence de formes semblables, d'un format plus grand ou plus petit, sans que R soit affecté, ou du moins que les limites que nous nous sommes fixées arbitrairement soient dépassées. Ces données ne sont que provisoires et destinées à faciliter l'énumération, elles tomberont d'elles-mêmes lorsqu'une étude plus poussée nous aura permis d'utiliser le cadre de la systématique bactérienne.

L'ensemble de nos recherches a porté sur une centaine d'échantillons appartenant à quinze grottes; ils correspondent à une quarantaine de faciès. Cet ensemble se répartit géographiquement sur les Pyrénées centrales et orientales, les Causses occidentaux et orientaux. Le travail de prospection nous a amené à regrouper nos observations suivant quatre grottes types que nous énumérons ci-dessous, avec les indications qui permettent de les situer et les retrouver, notamment les coordonnées d'après la carte d'Etat-Major:

Grotte de Sainte-Catherine – Commune de Balaguères (Ariège)
coordonnées: 493, 40–73, 80–560,

Grotte de Réveillon – Commune d'Alvignac (Lot)
coordonnées: 546, 95–280, 82–300,

Grotte d'En Gorner – Commune de Rio (Pyrénées orientales)
coordonnées: 449–716, 80–400,

Aven d'Orgnac – Commune d'Orgnac l'Aven (Ardèche)
coordonnées: 766, 30–226, 30–305.

Cette localisation géographique nous conduira à préciser le caractère ubiquiste ou endémique des microorganismes étudiés mais nous insis-

tons sur le fait que nous n'avons pas, à beaucoup près, prospecté toutes les cavernes des régions citées – toutes ne sont d'ailleurs pas découvertes – et que nous ne possédons que des données fragmentaires sur les autres régions. Il est toutefois bien évident que l'absence complète, dans un périmètre bien prospecté, d'un genre fréquent ailleurs, paraît suffisamment probante.

Nous avons, dans nos examens, séparé les sédiments argileux et les produits de corrosion de parois et de concrétions. Les sédiments argileux correspondent à la définition ci-dessus et ont été amenés dans les grottes pendant une phase de remplissage; ils ont été remaniés sur place par les crues, souvent même pendant une phase de surcreusement. Les produits de corrosion qui renferment également une fraction argileuse plus ou moins illitique, se sont formés, au contraire, en place. Cette distinction est valable du point de vue sédimentologique et spéléologique et nous avons dû la garder pour nous référer à la littérature mais ne l'est plus, du point de vue microbiologique, par le fait même que les dépôts, quelle que soit leur origine, voisinent ou se superposent; il est impensable qu'ils puissent, ici, se comporter différemment, à moins, ce qui serait exceptionnel, d'une rupture dans l'équilibre physique ou chimique. Les différences observées peuvent être momentanées et dues à un apport plus abondant de matière organique, au niveau des corrosions – ceci est d'ailleurs une des conditions des corrosions souterraines –; cet apport organique peut reconstituer un milieu de surface lorsqu'il est continu; quand il est intermittent, les différences, par rapport aux sédiments souterrains argileux s'effacent progressivement dans le temps; malgré le nombre d'échantillons examinés, il est donc possible que les variations quantitatives ou qualitatives observées s'atténuent en présence de statistiques plus fournies.

Ces précisions étant apportées, quelles sont les formes rencontrées et leur répartition? Nous en avons fait cinq groupes.

Un premier groupe est constitué par des éléments microscopiques fusiformes symétriques suivant les deux axes, à extrémités plus ou moins arrondies et sans prolongements apicaux, à surface généralement régulière. R est compris entre 2,5 et 3. La longueur varie entre 1 et 2 microns et la largeur entre 0,4 et 0,8 micron. Ce type porte souvent, sur le côté, une vésicule claire (Fig. 4). Il est présent sur 62% des sédiments argileux et des produits de corrosion examinés. Les formes à surface plus ou moins ridée sont beaucoup plus rares (19% des sédiments argileux et 9% des produits de corrosion); certaines ont un aspect lévuroïde, sont plus ou moins normalement bourgeonnantes

(Fig. 2) et n'apparaissent pas sur les produits de corrosion. L'ensemble du groupe est ubiquiste pour les régions examinées et nous a fourni 3 souches en culture.

Un deuxième groupe comprend des éléments microscopiques fusiformes asymétriques suivant le petit axe et légèrement apiculés suivant le grand axe, à surface lisse. R est compris entre 1,5 et 2. La longueur varie entre 0,7 micron et 1 micron et la largeur entre 0,5 et 0,7 micron (Fig. 3). Ils donnent parfois – sur 9% des sédiments argileux – suivant l'axe de dissymétrie une expansion latérale qui s'isole en un organite sphérique beaucoup plus résistant au bombardement des électrons (Fig. 4). 38% des sédiments argileux et 45% des produits de corrosion présentent ces organismes. Des éléments du type mycobactérie, beaucoup plus rares (5% des sédiments argileux et 9% des produits de corrosion), faisant en moyenne 0,2 micron à 1,4 micron de long, sur 0,2 micron à 1 micron de large – ces dimensions variant notablement sans que R soit affecté – présentent de nombreuses figures de bourgeonnement; ils sont irrégulièrement asymétriques, irrégulièrement apiculés, à surface ridée et très sensibles aux électrons (Fig. 5). A l'exception des types mycobactéries qui sont des endémiques pyrénéens, tous sont ubiquistes; ils ont fourni 2 souches en culture.

Un troisième groupe rassemble des éléments microscopiques fusiformes symétriques, nettement apiculés suivant le grand axe et portant des prolongements filiformes plus ou moins rigides, plus ou moins longs, en continuité avec le fuseau; ce groupe a donné de bons résultats en culture avec 4 souches où les prolongements prennent de l'importance (Fig. 6 et 7). R est compris entre 3,5 et 6. Les dimensions varient entre 1,4 et 3,2 microns pour la longueur et 0,4 à 0,8 micron pour la largeur. Ce type figurait sur 38% des sédiments argileux et 18% des produits de corrosion. Il convient de rattacher ici des éléments filamenteux renflés tantôt à une extrémité, avec des aspects en masse d'arme, tantôt sur le parcours; au lieu de renflements, on observe souvent des étranglements. Renflements et constriction ne semblent pas apparaître suivant une périodicité définie. L'ensemble a un aspect rigide ou flexueux. R n'est plus significatif. La longueur totale des filaments varie entre 10 microns et 30 microns mais en règle générale, elle oscille autour de 10 microns; leur largeur au niveau des dilatations varie entre 0,5 micron et 1 micron, en dehors des dilatations entre 0,1 micron et 0,5 micron. Ils se développent sur 33% des sédiments argileux et 18% des produits de corrosion; mais aucune souche n'ayant pu être obtenue en culture, du moins avec le type de milieu utilisé, il y a lieu de formuler des réserves sur l'originalité de ces formes

filamenteuses du milieu naturel. Les formes filamenteuses sont ubiquistes, les autres sont endémiques pour les Pyrénées et les Causses occidentaux.

Un quatrième groupe est formé d'éléments fusiformes, en général symétriques, tronqués suivant le grand axe, parfois bourgeonnants (Fig.8). Certains types sont fort peu dilatés ventralement et ont un aspect bacilliforme. Sauf quelques spécimens obtenus en culture, la surface est régulière. Des éléments cultivés présentent une zone centrale plus perméable aux électrons. En tout nous avons obtenu 3 souches. R est compris entre 1,5 et 7; étant donné l'allure en tonneau originale, il ne présente plus d'intérêt. La longueur oscille autour de 2 microns et la largeur varie entre 0,2 et 0,3 micron. En culture, le format augmente; on relève 3 microns sur 0,8 micron. On rencontre des formes nettement en tonneau sur 14% des sédiments argileux et 36% des produits de corrosion; dans les cavernes qui reçoivent, au moment des crues, plus de matière organique (type Aven), ces microorganismes sont plus fréquents et par leurs dimensions plus élevées $1,2 \times 4$ microns, ils deviennent accessibles au microscope ordinaire. Certains portent ventralement des bourgeons qui s'alignent les uns derrière les autres et donnent à l'ensemble un aspect ramifié; ces exemplaires plus rares ne figurent que sur 14% des sédiments argileux et 9% des produits de corrosion. Quand les contours sont plus nets, la ressemblance avec des cristaux de coryndon est frappante mais le doute n'est pas possible car, d'une part, le coryndon ne peut exister dans les formations géologiques auxquelles appartiennent les cavernes prospectées, d'autre part, nous avons obtenu en culture des formes en tonneau très abondantes, à contours d'ailleurs moins tranchés. Ce groupe est ubiquiste.

Enfin, dans un cinquième groupe, nous trouvons des éléments microscopiques fusiformes plus ou moins symétriques suivant le grand axe, à extrémités arrondies ou pointues mais non effilées, parfois plus ou moins tronquées, sans toutefois que cette troncature soit nette. Il s'agit là d'éléments allongés en cigare, présentant souvent, à l'intersection des axes, un renflement arrondi ou, en forme de navette; ces derniers sont particulièrement sensibles aux électrons surtout vers les extrémités (Fig. 9). Suivant l'allure générale R est compris entre 6 et 10. La longueur peut atteindre jusqu'à 4 microns et la largeur varie entre 0,2 micron et 0,4 micron. La fréquence sur les sédiments argileux varie entre 33% et 38% et sur les produits de corrosion entre 27 et 36%. Les microorganismes appartenant à ce groupe sont ubiquistes et nous en avons obtenu une souche en culture.

Groupement provisoire de ces microorganismes en «*Microfusiformetum*» de sédiments de grottes

Il n'est pas possible, dans l'état actuel de nos recherches de laboratoire, en présence d'une telle diversité morphologique, d'établir une systématique définitive; il est d'ailleurs probable que des espèces déjà identifiées s'y retrouveront. Néanmoins, nous avons poussé assez loin la prospection sur le terrain pour nous faire une idée de la répartition, de la fréquence, donc de l'importance que prennent dans la nature de tels microorganismes; cette importance, dans les milieux souterrains en particulier, justifie à elle seule un groupement provisoire.

Nous sommes en présence de formes toutes dérivées du fuseau, avec ou sans prolongements filamenteux, avec ou sans troncatures; elles sont libres, aciliées dans leur habitat naturel et nous ne pouvons, pour l'instant, préciser la nature des appendices observés sur le 3^e groupe en culture. On voit apparaître parfois, se dégageant de la cellule bactérienne, un organite sphérique (1^{er} groupe, 2^e groupe, 5^e groupe); cet élément fait penser à un sphéroïde mais, parfois, on assiste à un véritable bourgeonnement (1^{er} groupe, 2^e groupe, 4^e groupe). Ces caractères morphologiques découlent essentiellement de l'observation des milieux naturels et sont présentés ici dans un ordre purement conventionnel. Hormis les formes lévuroïdes bourgeonnantes (1^{er} groupe, 2^e groupe), l'ensemble s'apparente morphologiquement à la famille des Sphaerophoraceae (Prévot, 1938) qui possède tous les caractères soulignés (4). Mais nous proposons, à défaut de précisions d'ordre biochimique, de rassembler momentanément cet ensemble de microorganismes souterrains, très fortement apparentés entre eux, dans un groupe en attente que nous désignerons sous le nom de «*Microfusiformetum*» de sédiments de grottes, pour souligner justement l'originalité écologique et l'abondance.

Rappelons que le «*Microfusiformetum*» évolue au contact de sédiments – argileux à des titres divers – et dans l'eau, donc a une vocation tellurique et aquatique; on le rencontre dans des conditions anaérobies et ses cultures, en milieu liquide, sont anaérobies. En outre, sa présence, sur des faciès de corrosion organique, dans des sédiments qui gardent une teinture organique entre les apports successifs, son développement sur des milieux synthétiques dont la matière organique ne peut être exclue montrent que, s'il est peu exigeant sous le rapport de la matière organique, il n'en est pas moins hétérotrophe et associé aux processus de minéralisation. Enfin, les éléments qui le composent sont à croissance lente, comme la plupart des troglobies, ce qui explique, dans une certaine mesure, leurs faibles exigences.

Probabilité d'une double origine et d'un cycle

Si certains de ces organismes ne subissent aucune modification en culture, donnent au sein des argiles des bourgeonnements qui permettent de les assimiler à des autochtones en développement, d'autres, vraisemblablement allochtones, acquièrent en culture des prolongements apicaux, augmentent de format et par conséquent ne présentent, dans le milieu souterrain argileux, que des formes d'attente ou de conservation à définir. Une expérience conduite dans la grotte des «Trois frères» (Commune de Montesquieu-Avantès-Ariège) (Coordonnées: 508, 32-82-465), sur les sédiments d'une galerie difficile d'accès et jamais visitée, donc ne pouvant recevoir de pollutions massives, a confirmé cette façon de voir. Cette expérience a consisté à faire des apports, en des points précis, de substances organiques et minérales susceptibles d'être amenées par les eaux d'infiltration pendant les périodes d'activité microbienne des sédiments de surface: glucides solubles, acides aminés solubles, phosphates, sels ammoniacaux, nitrates, etc... Les analyses microbiologiques, au microscope électronique, ont été exécutées au départ puis au bout d'un mois. Les résultats ont confirmé la présence de deux groupes, l'un pouvant continuer à se développer lentement en présence d'une très faible quantité de matière organique, indifférent, dans les délais de l'expérience, à des apports supplémentaires, donc vraisemblablement autochtone, l'autre très sensible aux apports organiques, surtout à partir d'un seuil qui se situe au voisinage de 1% comme dans les sédiments de surface, donc vraisemblablement allochtone et pouvant être transporté par les eaux d'infiltration; le 3^e et 4^e groupe figureraient dans cette catégorie. Les deux se confondent en période de repos et nous les séparons difficilement à l'observation microscopique. Ces résultats confirmeraient en outre, au moins au niveau du «Microfusiformetum» des sédiments argileux, l'existence d'un cycle, lié indirectement aux saisons, qui ne semble pas avoir été admis, en raison des conditions climatiques uniformes mais, au contraire, souvent controversé par certains biospéléologues.

RÉSUMÉ

Des recherches ont été poursuivies sur la microflore des sédiments argileux de cavernes. Une partie des microorganismes qui la constituent, nécessitent, pour une étude correcte, des grossissements de l'ordre de 5000 et peuvent être séparés des sédiments argileux par une technique de mousse appropriée, puis, cultivés. Morphologiquement, on peut les répartir en

5 groupes mais ils constituent un ensemble homogène qui justifie leur groupement provisoire en «Microfusiformetum». Des expériences d'enrichissement des sédiments en place ont montré que certains de ces microorganismes étaient autochtones, d'autres allochtones.

ABSTRACT

Researches on the microflora of cave clay sediments were carried out. The study of these micro-organisms necessitates the use of an enlargement of the order of 5,000. For this purpose the organisms were separated from the clay sediments by the foam flotation technique, followed by cultivation. Morphologically they can be divided into 5 types but together they form a group sufficiently homogeneous to justify their provisional grouping as the "Microfusiformetum."

Experiments with enriched cultures from several sediments have shown that certain of the micro-organisms were indigenous, others were accidental inhabitants.

BIBLIOGRAPHIE

1. JEANNEL, R. — 1926: Faune cavernicole de France. Paul Lechevalier, Paris.
2. ORLIAC, CH.: Résultats non publiés. Laboratoire de minéralogie de la Faculté des Sciences de Toulouse.
3. POCHON, J., et TARDIEUX, P. — 1962: Techniques d'analyse en microbiologie des sols. Editions de la Tourelle, Saint Mandé.
4. PREVOT, AR. — 1961: Traité de systématique bactérienne. 2. Dunod, Paris.
5. RENAULT, PH.: Résultats non publiés. Laboratoire Souterrain du C.N.R.S.

LÉGENDE DES PLANCHES

PLANCHE 1

Fig. 1: D'après un grossissement de 4000 (1 à $2 \times 0,4$ à 0,8) microns. Aven d'Ornac. Sédiments argileux riches en limonite.

Fig. 2: D'après un grossissement de 5000 (1 à $2 \times 0,4$ à 0,8) microns. Grotte de Moulis. Formation originale dite «Sapins d'argile» à la surface des sédiments argileux de la salle d'Argile.

PLANCHE 2

Fig. 3: D'après un grossissement de 5000 (0,7 à $1 \times 0,5$ à 0,7) microns. Grotte du Cap de la Bouich. Sédiments argileux sous un plancher stalagmitique.

Fig. 4: D'après un grossissement de 5 000 ($1,8 \times 0,5$) microns. Grotte de Sainte-Catherine. Sédiment argileux.

PLANCHE 3

Fig. 5: D'après un grossissement de 5 000 ($0,2$ à $1,4 \times 0,2$ à 1) microns. Grotte de Sabouche. Sédiment argileux roulé en billes.

Fig. 6: D'après un grossissement de 5 000 ($1,4$ à $3,2 \times 0,4$ à $0,8$) microns. Grotte de Moulis. Sédiment argileux de la salle d'argile.

PLANCHE 4

Fig. 7: D'après un grossissement de 2 000 ($3,2 \times 0,8$) microns non compris le prolongement filiforme. Grotte de Sainte-Catherine. Mise en culture d'échantillons divers.

Fig. 8: D'après un grossissement de 3 000 ($3 \times 0,8$) microns. Mise en culture de produits de corrosion émanant de diverses grottes.

PLANCHE 5

Fig. 9: D'après un grossissement de 7 500 ($3,2 \times 0,4$) microns. Grotte de Sainte-Catherine-Dolomie pourrie en place.

Algae and their Mode of Life in the Baradla Cave at Aggtelek II

By GEORGE CLAUS¹⁾

With plates 6(1)–8(3)

On page 16 of our publication which appeared in 1955 (1) we published a table concerning algae which we collected in the cave of Aggtelek, cultured on sun light, returned them into the cave and reexamined after six months. Already in this publication we pointed out that we did not remove the entire algal material from the cave since it was our intention to carry out a further control examination after another six months. (Unfortunately, we could not quite adhere to the planned six months interval and investigation of the material in the jars could only be carried out after approximately eight months.)

In the following we will briefly summarize the dates on which examinations in the cave were carried out.

On July 11, 1953 we made the first collection. The material which came from this collection and which was then cultured on sun light was returned into the cave on June 22, 1954 at the following three places:

First jar: Around the center of Nádor Street, on the left side, where the path broadens, in a groove of the wall, in a height of about 2 m.

Second jar: Further down on the left side of Nádor Street, about 15 m. after the first projection, at the back of a large stalactite, in a height of 2.5–3 m.

Third jar: Before the end of Nádor Street, on the left side, at the second projection, after the terrace, in a groove of the wall, at a height of 2 m.

(Consequently, all three jars were placed at a distance of 5–600 m. from the entrance.)

On December 12, 1954 we took the first samples from the glass dishes. The above mentioned table (1955.p.16.) contains the species we retrieved at the time.

On October 13, 1955 we removed the glass boxes for the last time. At this occasion, we carefully wrapped the jars in black paper and kept

¹⁾ New York University-Medical Center.

them that way until we carried out the control tests to prevent their being exposed to light. The algae which thus turned up at the occasion of identification had therefore been 17 months, from June 22, 1954 until October 13, 1955 in the cave in complete darkness. The enclosed photos show our jars after they had been brought up from the cave. It can be seen from these photos that the algal material kept its hue in the past time interval; and the microscopical examinations show that our algae weathered out the past time period not in the form of spores or cysts leading a latent life. Although no proliferation on large scale took place they nevertheless kept their original consistency. That despite the long period of darkness no degenerative processes took place we were able to prove by exposing our cultures again to sun light and, in consequence, our algae in the glass boxes began to proliferate on large scale and formed abundant cultures. At the occasion of our next control test in December 1957 we were again able to recognize the species we had in October 1955.

We wish to point out as an interesting fact that we filled up our cultures during these four years only three times with sterile Knopp solution and only once, in June 1954, at the time of returning the algae to the cave, with water from the brook of the cave. *Above fact greatly reduces the possibility of the hitherto known chemosynthetic processes concerning the assimilation of the algae in the jars.* After closing our tests, in January 1958, we prepared exiccata from our cultures.

In the following table we summarize the results obtained concerning the three jars:

As can be seen from the above table, we originally replaced 31 species in the cave. From these we succeeded after 6 months to determine 22 and after another 8 months only 13. The apparent loss is therefore 18 species which is to be attributed mainly to the Cyanophyta and the filamentous Chlorophyta. This loss, however, is therefore a seeming one because in December, 1957, i.e. at the time when the control test was carried out, after culturing on sun light we again succeeded in finding 4 species which did not appear at the time of our preceding determination. It is therefore obvious that also in 1954 and 1955 respectively, they had to be present in the material and escaped our attention only because of their small number.

Plectonema puteale, *Phormidium henningsii*, *Schizothrix fragilis*, *Fragilaria virescens* and *Tetraspora tarnayana* were the species which we did not succeed in finding in any of our redeterminations.

Finally, we would like to mention that at the occasion of all three determinations *Synechococcus elongatus*, *Phormidium dimorphum*,

Table

Species	Number of jar			Redetermination		
	I	II	III	1954 XII.	1955 X.	1957 XII.
CYANOPHYTA						
<i>Synechococcus elongatus</i>			+	+	+	+
<i>Plectonema puteale</i>			+			
<i>Nostoc punctiforme</i>	+					+
<i>Spirulina laxa</i>	+			+		
<i>Pseudanabaena tenuis</i>			+	+	+	+
<i>Oscillatoria tenuis</i>		+		+		
<i>Oscillatoria neglecta</i>		+				+
<i>Oscillatoria limnetica</i>			+	+	+	+
<i>Oscillatoria geminata</i>	+			+	+	+
<i>Oscillatoria agardhii</i>			+	+	+	+
<i>Phormidium foveolarum</i>	+			+		
<i>Phormidium henningsii</i>			+			
<i>Phormidium dimorphum</i>		+		+	+	+
<i>Lyngbya diguetii</i>			+	+		
<i>Lyngbya martensiana</i>			+	+		
<i>Schizothrix fragilis</i>		+				
<i>Schizothrix cyanea</i>		+	+	+		
CHRYSTOPHYTA						
<i>Ophyocythium parvulum</i>		+		+	+	+
<i>Ochromonas ovalis</i>	+			+	+	+
<i>Fragilaria virescens</i>		+				
<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>		+		+		
<i>Nitzschia thermalis</i>		+		+	+	+
CHLOROPHYTA						
<i>Gloeococcus schröterii</i>	+		+	+	+	+
<i>Tetraspora tarnayana</i>	+					
<i>Chlorococcum infusionum</i>	+	+		+	+	+
<i>Chlorella miniata</i>		+	+	+	+	+
<i>Oocystis pusilla</i>	+					+
<i>Protococcus anulatus</i>		+	+	+	+	+
<i>Hormidium flaccidum</i>		+	+	+		
<i>Stichococcus bacillaris</i> f. <i>minor</i>			+			+
<i>Rhizoclonium hieroglyphicum</i>			+	+		
Total:	9	13	15	22	13	17

Gloecoccus schröterii, *Chlorococcum infusionum*, *Chlorella miniata* and *Protococcus anulatus* appeared with the largest number, in other words mostly Chlorophyta and not Cyanophyta as was expected. We cannot give any explanation for this fact. However, Suba (2) directs the attention to a similar circumstance in her publication concerning the examinations carried out on algae of the Cave of Pálvölgy. The author succeeded in finding numerous Chlorophyta from the most hidden points of the cave while from places relatively nearer to the entrances she discovered mostly Cyanophyta. Evidently, we cannot draw conclusions from these two data, however, they seem to point to the fact that the very primitive Chlorophyta are more able to endure lack of light than some filamentous Cyanophyta.

SUMMARY

The author provides additional data to his publication of 1955. In a table he shows his results concerning 31 algal species which were returned to the cave of Aggtelek on June 22, 1954. When carrying out his control tests he found the decrease in the number of species to be 9 after 6 months and 18 after a further 8 months. In December 1957, after culturing on sun light however he was able to show again the presence of 17 species, but in his cultures *Synechoccus elongatus*, *Phormidium dimorphum*, *Gloecoccus schröterii*, *Chlorococcum infusionum*, *Chlorella miniata* and *Protococcus anulatus*, appeared with the largest individual numbers and not the Cyanophyta as could have been expected.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser stellt zusätzliche Angaben zu seiner Arbeit von 1955 zur Verfügung. In einer Tabelle führt er seine Ergebnisse bezüglich 31 Algenarten an, welche am 22. Juni 1954 in die Aggteleker Höhle zurückgebracht wurden. Bei Durchführung seiner Kontrolluntersuchungen fand er, daß die Anzahl der Arten nach 6 Monaten um 9 und nach weiteren 8 Monaten um 18 abnahm. Im Dezember 1957, nach Züchten bei Sonnenlicht war es dem Verfasser möglich, wieder die Gegenwart von 17 Arten aufzuweisen, doch erschienen in seinen Züchtungen anstatt der Cyanophyta, wie erwartet, die *Synechoccus elongatus*, *Phormidium dimorphum*, *Gloecoccus schröterii*, *Chlorococcum infusionum*, *Chlorella miniata* und *Protococcus anulatus* mit der größten Anzahl.

REFERENCES

1. CLAUS, G. — 1955: Algae and Their Mode of Life in the Baradla Cave at Aggtelek. Acta. Bot. Acad. Sci. Hung. 2:1–26.
2. SUBA, E. — 1957: Angaben zur Algenflora des Pálvölgyer Höhle in Ungarn. Verh. Öster. zool.-bot. Ges., Wien 97:97–110.

EXPLANATION OF PLATES

PLATE I

1. First jar: (Somewhat smaller than actual size.)
2. First jar: The bark-like, dark, greenish-blue algal coating covering the stalactite is well visible. Upwards from the end of the stalactite thalli of *Oscillatoria geminata* and *Chlorococcum infusum*. (Somewhat larger than normal size.)

PLATE II

1. Second jar: (Somewhat smaller than normal size.)
2. Second jar: In the middle and on the right side of the picture mostly greenish-yellow thalli of *Chlorella miniata* and *Protococcus anulatus* are visible. (Somewhat larger than normal size.)

PLATE III

1. Third jar: (Somewhat smaller than normal size.)
2. Third jar: The stalactite on the right side of the picture is covered by dark, bark-like, greenish-black coating. For the sake of better demonstration this coating had been removed from part of the stalactite. In forming this coating mostly *Synechococcus elongatus*, *Pseudanabaena tenuis* and *Oscillatoria agardhii* took part. The olive green thalli visible on the entire picture are mostly *Chlorella miniata*, *Gloeococcus schröterii* and *Protococcus anulatus*.