

Étude de la dénitrification dans les sols de rizière du Sénégal*

Jean-Louis GARCIA

Laboratoire de Microbiologie du Sol,
ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

RÉSUMÉ

L'étude relative à la dénitrification dans les sols a porté sur le rôle de divers facteurs physico-chimiques et sur la séquence des produits formés au cours du processus. Une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification qui est basée sur la mesure de la vitesse de réduction de N_2O a été élaborée. L'étude de l'influence de la rhizosphère du riz sur la dénitrification a pu être réalisée grâce à cette méthode et au moyen de dispositifs simples. Cette méthode a en outre été utilisée pour étudier les conditions de la dénitrification dans les rizières et proposer une solution pour limiter les pertes d'azote minéral qui en résultent.

La séquence des produits de la dénitrification a été étudiée à partir de cellules entières et d'extraits non purifiés chez deux bactéries isolées au Sénégal, une nouvelle souche de la bactérie sulfo-oxydante et chimio-lithotrophe *Thiobacillus denitrificans* et une bactérie sporulée, thermophile, apparentée à *Bacillus thermodenitrificans*. Une nouvelle population microbienne a été mise en évidence dans les sols de rizière du Sénégal; elle est représentée par des espèces du genre *Bacillus* capables d'utiliser des concentrations élevées de nitrite. Certaines d'entre elles croissent en anaérobiose au dépens de l'oxyde nitrique et font fermenter le glucose. D'autre part, les produits de la séquence de la dénitrification ont été identifiés chez des souches de collection et chez de nouvelles espèces dénitrifiantes isolées en France et au Sénégal en utilisant l'oxyde nitreux comme substrat respiratoire.

MOTS-CLÉS : Dénitrification — rizière — Sénégal — rhizosphère — Mesure *in situ* — bactéries dénitrifiantes — *Bacillus* — Revue.

INTRODUCTION

La dénitrification est la réduction dissimilatrice du nitrate en gaz (N_2O et N_2). Il s'agit d'un processus respiratoire anaérobie qui confère à certaines espèces bactériennes, la faculté d'utiliser le nitrate et d'autres composés oxygénés minéraux de l'azote comme accepteurs d'électrons.

SUMMARY

STUDY OF DENITRIFICATION IN SENEGALESE PADDY SOILS

The examination of the influence of various physico-chemical factors and the study of the sequential products formed during the denitrification in Senegalese paddy soils were performed and a new method for assessing this process was developed. This method is based on the study of N_2O reduction and has been used to check the actual data of denitrification in rice soils, suggesting an original solution to prevent losses of mineral nitrogen. The study of the influence of the rice rhizosphere on the denitrification has been facilitated by this new method involving the use of simple devices.

The sequential products formed during the denitrification process have been studied using resting cells and crude extracts from two bacteria isolated in Senegal: a new strain of the denitrifying chemolithotrophic sulfo-oxidizer *Thiobacillus denitrificans* and a sporulating thermophilic bacterium related to *Bacillus thermodenitrificans*. An analysis of the denitrifying microflora of Senegalese paddy soils revealed the existence of new species in the *Bacillus* population which are able to use high nitrite concentrations; some of these bacteria grew anaerobically with nitric oxide and were glucose fermenters. A study of denitrification was performed on resting cells of collection strains or new denitrifying strains isolated in France and Senegal using nitrous oxide as respiratory substrate.

KEY WORDS: Denitrification — Paddy soils — Senegal — Rhizosphere — *in situ* measurement — Denitrifying bacteria — *Bacillus* — Review.

En agriculture, le processus de dénitrification aboutit à une perte de l'azote du sol et de celui qui y est apporté sous forme d'engrais. De nombreuses études concernent le mécanisme de la dénitrification, ses étapes intermédiaires et l'influence de certains facteurs physico-chimique [1]. L'influence des plantes vivantes a fait l'objet de peu de recherches qui ont porté principalement sur les sols exondés où l'anaérobiose s'éta-

* Résumé de la thèse de Docteur ès Sciences présentée le 12 janvier 1978 à l'UER Scientifique de Luminy (Université d'Aix-Marseille II).

blit par suite à une consommation importante d'oxygène par les racines et les microorganismes qui prolifèrent à proximité [2].

Les sols de rizière sont généralement riches en carbone organique provenant de la décomposition des résidus de récolte. Pendant la culture du riz, les sols sont anoxiques par suite de la submersion et constituent ainsi un milieu particulièrement propice à la dénitrification. Et bien que les engrais azotés soient essentiellement le sulfate d'ammonium et l'urée, du fait que le riz absorbe préférentiellement l'azote ammoniacal, on observe des pertes d'azote importantes (de 25 à 50 pour cent de l'engrais ajouté suivant les auteurs). La submersion entraîne en effet d'importantes modifications biologiques et chimiques : alors que le potentiel d'oxydoréduction baisse dans le sol, une zone oxydée s'établit sur une distance de quelques mm à quelques cm de la couche supérieure, directement au contact de la lame d'eau. Dans cette zone, l'oxygène est fourni par l'eau de submersion, par les nombreuses colonies d'algues se développant à la surface et par l'exsudation de diverses plantes aquatiques. Cette zone oxydée est propice à la vie microbienne aérobie et notamment à la nitrification. Le nitrate produit à partir des engrais ammoniacaux épandus en surface diffuse dans la zone réduite sous-jacente où il est réduit en gaz par la dénitrification [3].

1. ÉTUDE SUR LE SOL

1.1. SOL NU

1.1.1. Influence des facteurs physico-chimiques

Dans les sols submergés, la fraction de carbone organique soluble et facilement assimilable est l'un des facteurs majeurs. C'est ainsi que lors d'une étude de l'activité dénitrifiante potentielle de 29 sols de rizière du Sénégal, au respiromètre de Warburg, une corrélation de rang positive et hautement significative a pu être mise en évidence entre cette activité potentielle déterminée par le temps nécessaire pour la dénitrification des 100 ppm d'azote nitrique apporté lors de l'expérience et la teneur en carbone organique des sols [4]. Lorsque l'on enrichit les sols les plus pauvres avec du succinate de sodium de manière à amener la teneur en carbone à la même valeur que celle du sol le plus riche, les vitesses de dénitrification se trouvent égalisées après cependant un temps de latence plus ou moins long. Cette influence favorable du carbone organique sur l'activité dénitrifiante se retrouve également dans l'effet rhizosphère qui sera examiné plus loin.

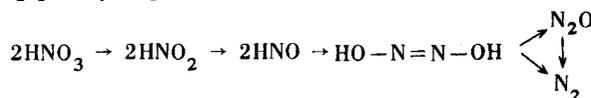
La vitesse de dénitrification est faible en condition acide et augmente avec le pH pour atteindre un optimum vers la neutralité. Cependant nous n'avons pu mettre en évidence qu'une corrélation faiblement significative entre la dénitrification et le pH des 29 sols de rizière dans l'expérience précédente alors qu'une corrélation positive hautement significative était décelée entre le pH et le nombre initial de bactéries dénitrifiantes [4].

La salinité peut se révéler un facteur important dans les rizières installées sur d'anciennes mangroves ce qui est le cas de certains sols de rizière de la côte ouest de l'Afrique. Pour les 29 sols du Sénégal, une corrélation inverse hautement significative a été mise en évidence entre l'activité dénitrifiante potentielle et la teneur en chlorures [4].

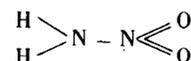
Seule une faible corrélation a été décelée entre l'activité dénitrifiante et le nombre initial de bactéries dénitrifiantes [4].

1.1.2. Séquence des produits formés

Différents schémas ont été proposés pour expliquer la succession des réactions qui interviennent dans la réduction du nitrate en gaz. Selon Kluyver [5], le nitrite serait réduit en un composé hypothétique, le radical nitroxyle HNO qui se dimériserait en un composé très instable, l'acide hyponitrique HO-N=N-OH. Ce dernier donne N₂O par déshydratation et N₂ par hydrogénation :

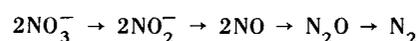


D'autres composés ont été proposés en remplacement du nitroxyle et de l'hyponitrite, notamment la nitramide



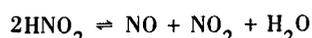
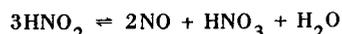
l'hydroxylamine NH₂OH et la nitrohydroxylamine NO₂NHOH. Mais aucune preuve formelle n'a pu être établie quant à la présence de l'un de ces composés dans le sol ou dans le milieu de culture d'une bactérie dénitrifiante. En outre, ces corps sont très instables pour la plupart et se décomposent spontanément en donnant N₂, N₂O et parfois NO.

Actuellement, on a tendance à considérer l'oxyde nitrique comme l'unique intermédiaire entre le nitrite et l'oxyde nitreux :



Dans la précédente série de sols nous avons étudié la séquence des produits formés lors de la dénitrification *in vitro* en couplant le dosage chimique du nitrate et du nitrite à l'analyse des gaz par chromatographie en phase gazeuse. L'analyse des résultats à

l'aide du test de corrélation des rangs de Spearman a permis de confirmer certaines données essentielles [6]. Le nitrite constitue le premier intermédiaire de la dénitrification; il s'accumule dans les sols alcalins alors qu'on ne le décèle pas en grande quantité dans les sols acides où il est rapidement réduit. Une accumulation d'oxyde nitrique a été décelée pour la moitié des sols; elle a été importante pour 4 d'entre eux seulement. Cette production occasionnelle de NO est généralement attribuée à une décomposition chimique du nitrite en milieu acide suivant les réactions



Une corrélation étroite a en effet été mise en évidence entre les quantités de NO accumulées et les faibles quantités de nitrite détectées et une corrélation inverse a été mise en évidence entre la quantité de NO et le pH des sols. Dans tous les cas où une formation de NO a été observée, ce composé est ultérieurement réduit puisqu'il disparaît toujours de la phase gazeuse en donnant N₂O et N₂.

Une étude complémentaire sur 3 sols de rizière ayant accumulé une quantité importante de NO lors de la dénitrification *in vitro* du nitrate ajouté, a montré que l'accumulation de l'oxyde nitrique résulte partiellement d'un processus biologique pour l'un des sols étudiés [7]. En effet, le sol non stérile accumule deux fois plus de NO que le sol stérilisé et cette accumulation diminue lorsqu'on augmente la température d'incubation. Elle présente un optimum vers la neutralité et augmente lorsqu'on accroît l'humidité du sol; en outre, elle augmente beaucoup moins fortement que dans les deux autres sols lorsque la concentration en nitrite croît.

Dans la précédente série de sols étudiés, nous avons toujours constaté l'accumulation transitoire de quantités plus ou moins grandes de N₂O [6]. Une corrélation inverse et hautement significative a été trouvée entre la quantité maximale de N₂O accumulé et le pH des sols, ce qui confirme les observations antérieures établissant que la production de l'oxyde nitreux est maximale dans les sols acides et minimale à la neutralité. La réduction ultérieure de N₂O en N₂ se produit dans tous les cas, et le plus souvent la vitesse de réduction est voisine de la vitesse de formation. Ces deux vitesses présentent une corrélation positive hautement significative avec la vitesse de réduction de NO₃⁻ et la teneur des sols en carbone organique. Cette observation nous a suggéré la possibilité d'une estimation de la dénitrification fondée sur l'étude de la réduction de N₂O, substrat gazeux très soluble pouvant être très facilement ajouté à des échantillons de sol saturés d'eau sans un séchage préalable.

1.1.3. Mise au point d'une nouvelle méthode de mesure

On mesure la disparition de l'oxyde nitreux de la phase gazeuse des flacons contenant les échantillons de sol incubés dans les conditions optimales de réduction de ce gaz [3] : flacons sérum de 250 ml en position allongée, quantité de sol inférieure à 50 g (le sol est saturé en eau et ne doit pas renfermer de nitrate), anaérobiose parfaite obtenue par un vide poussé et répété suivi chaque fois d'un gazage à l'hélium, l'oxygène inhibant la réduction de N₂O, incubation à 37°C. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, la quantité de N₂O ajouté est celle qui permet d'obtenir une vitesse de réduction égale à la moitié de la vitesse maximale (2 % et 10 % d'oxyde nitreux respectivement). On utilise un gaz inerte, le krypton, comme étalon interne.

L'activité est en étroite relation avec le pH du sol testé; ce paramètre n'est pas modifié pour la mesure car il constitue une caractéristique propre à chaque sol. Cette méthode appliquée à un sol de rizière a permis de mesurer deux activités distinctes : la première ayant lieu au cours des six premières heures d'incubation représente l'activité dénitrifiante initiale présente dans le sol au moment du prélèvement (ou préalablement induite dans diverses expériences); la deuxième représente une activité dénitrifiante potentielle induite par le N₂O introduit pour la mesure et se traduit par une accélération de la vitesse de réduction du N₂O. Cette dernière activité résulte de la synthèse *de novo* de l'oxyde nitreux-réductase après une phase de latence.

L'existence de ces deux activités a été confirmée par l'emploi du chloramphénicol [9]. Une corrélation des rangs hautement significative et positive a été obtenue entre les activités mesurées après enrichissement en nitrate par la technique respirométrique dans une série de sols de rizière [8].

Les mesures effectuées après induction préalable de l'activité dénitrifiante dans le sol montrent que l'induction peut être très importante, mais qu'elle est suivie d'une diminution d'activité qui résulterait au moins partiellement de l'épuisement de l'oxyde nitreux au cours de l'incubation [9].

Ces résultats montrent que l'activité mesurée après une longue période d'incubation ne représente qu'une faible fraction de l'activité réelle qui aurait pu être induite dans le sol à un moment donné par suite d'une importante accumulation d'un composé oxygéné de l'azote.

1.1.4. Application à la culture du riz

Cette méthode a pu être appliquée à des mesures en pots et au champ grâce à l'élaboration d'un matériel

approprié. Ce dernier comprend entre autres, une étuve à ventilation fonctionnant sur batteries, une rampe de gazage utilisant une pompe à vide manuelle et des tubes Vacutainer sous vide permettant le prélèvement d'échantillons gazeux qui seront analysés ultérieurement au laboratoire [10]. Nous avons vérifié que la distribution des mesures effectuées dans une rizière suit une loi Normale et que 10 mesures sont généralement suffisantes pour obtenir une estimation satisfaisante de la moyenne [9].

La méthode a été utilisée pour tester l'influence d'engrais-retard réputés libérer lentement l'azote et de l'enfouissement de l'urée sur l'activité dénitrifiante dans des cultures de riz en pot. Il a ainsi été confirmé que l'enfouissement de l'engrais azoté n'entraîne qu'une perte d'azote faible ou nulle, contrairement à ce qui est observé dans le cas d'une application en surface, une partie de l'azote étant perdue dans la séquence nitrification-dénitrification. Ceci a une répercussion très nette sur le rendement de la récolte.

Ce procédé est en cours de développement en Extrême-Orient où l'I.R.R.I. préconise de concentrer l'urée dans des petites boules de terre, les « mudballs », qui sont enfouies à 10 cm de profondeur après repiquage du riz. L'I.R.R.I. a également mis au point une machine manuelle permettant d'introduire l'engrais azoté en profondeur, entre les pieds de riz [12].

La solution la plus avantageuse pourrait donc consister à enfouir avant la submersion et en un seul apport, un engrais-retard approprié comme l'urée enrobée de soufre. Bien que son prix de revient dépasse de 30 % celui des engrais conventionnels, il en résulterait néanmoins une économie du fait que ces derniers doivent être apportés en plus grande quantité et en deux apports échelonnés au cours de la culture du riz.

1.2. RHIZOSPHERE DU RIZ

La dénitrification dans la rhizosphère du riz était encore peu étudiée lorsque nous avons commencé nos recherches [1]. Contrairement à ce qui se passe dans la rhizosphère des plantes cultivées en sol exondé où, selon Woldendorp l'anaérobiose s'établit rapidement par suite d'une consommation importante d'oxygène par les racines et les microorganismes qui prolifèrent à proximité [2], il existe dans la rhizosphère du riz, une zone aérobie engendrée par l'exsudation d'oxygène par les racines. Or il est indiscutablement reconnu que la dénitrification ne peut se produire en condition aérobie [27]. Le problème se posait donc de savoir si la dénitrification pouvait avoir lieu ou non dans la rhizosphère du riz.

A l'aide du respiromètre de Warburg, nous avons pu montrer, dans un premier temps, que le riz exerce un effet stimulant sur l'activité dénitrifiante potentielle; cette stimulation, strictement localisée à la mince pellicule de sol adhérent aux racines, est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique [13]. Ce résultat a été confirmé en évaluant la dénitrification par la mesure de la vitesse de réduction de N_2O [8]. Le nombre de bactéries dénitrifiantes est en général nettement plus élevé dans la rhizosphère du riz que dans le sol éloigné; mais il convient de rappeler qu'en condition aérobie, les bactéries dénitrifiantes sont capables de se développer sans dissimuler le nitrate, donc que leur présence en plus ou moins grand nombre ne reflète pas nécessairement l'importance du processus de dénitrification.

Nous avons pu d'autre part, induire une activité oxyde nitreux-réductase *in vitro* dans un sol nu ou planté en riz, dans des dispositifs appropriés dans lesquels la rhizosphère du riz est représentée par le système plantule âgée de 3 semaines et 15 g de sol dans lesquels elle s'est développée en tube de verre [14-15]. L'activité induite par le N_2O préalablement à la mesure est 4 fois plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol témoin non planté, lorsque le N_2O est mis directement au contact de la rhizosphère en atmosphère anaérobie. Elle est seulement deux fois plus élevée lorsque le N_2O est mis au contact de la partie aérienne de la plantule et diffuse vers les racines probablement par la même voie que l'oxygène.

Malgré tout, puisqu'il y a eu induction de l'enzyme responsable de l'activité, induction qui est strictement inhibée par O_2 , l'oxyde nitreux a probablement diffusé dans une zone de sol où l'influence de l'oxygène ne s'est pas manifestée, mais qui est néanmoins atteinte par les exsudats racinaires, puisque l'activité y est plus grande que dans le sol nu. Il y aurait donc, dans la rhizosphère du riz, des zones anaérobies dans lesquelles les processus biologiques peuvent se manifester avec une plus grande intensité que dans le sol non planté, par suite de la présence d'une plus grande quantité de substances directement assimilables et d'une densité bactérienne plus élevée.

L'effet rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle a pu également être décelé dans des expériences en pots et au champ; il est maximum dans les premiers stades de la croissance et diminue progressivement avec l'âge des plantes [11]. Bien que les conditions de la dénitrification dans la rhizosphère du riz soient nettement plus favorables qu'en sol nu, les pertes d'azote y sont néanmoins plus faibles. Ceci pourrait résulter de l'absorption de NH_4^+ par les plantes avant qu'il ne soit oxydé puis perdu par dénitrification.

2. ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE

2.1. GÉNÉRALITÉS

La respiration des composés oxygénés minéraux de l'azote est un privilège du monde bactérien. Les algues vertes, les cyanophycées, les champignons et quelques espèces de levures utilisent, en aérobiose, le nitrate comme aliment azoté. Mais aucun de ces organismes ne peut croître, en anaérobiose, aux dépens de NO_3^- comme accepteur d'électrons respiratoire.

La réduction du nitrate en oxyde nitreux et azote, dénommée dénitrification, présente tous les attributs d'une véritable respiration cellulaire :

— Le transfert des électrons entre le NADH_2 et NO_3^- n'est pas direct et met en jeu divers transporteurs comprenant en particulier un cytochrome de type *b* et des quinones [16]. Chez *Pseudomonas denitrificans* qui est en réalité une espèce mal définie du genre *Alcaligenes*, la nitrite-réductase utilise deux cytochromes de type *b* et un de type *c* [18] tandis que des cytochromes de types *b* et *c* participeraient également au mécanisme de transport d'électrons dans la réduction de l'oxyde nitreux en N_2 [19].

— Des phosphorylations oxydatives couplées au transport des électrons par ces chaînes se produisent pour la réduction du nitrate [16] et du nitrite [20].

— Le cycle de Krebs joue le rôle de voie d'oxydation terminale de l'acétate chez les bactéries dénitrifiantes chimio-organotrophes aussi bien en anaérobiose en présence de nitrate qu'en aérobiose [21].

— La nitrate-réductase A, qui se trouve à l'état particulaire dans les extraits, est solidaire de la membrane cytoplasmique [22]. Il semblerait qu'il en soit de même pour l'oxyde nitreux-réductase [23].

Le mécanisme de la réduction du nitrate en azote a été établi chez plusieurs bactéries. Il comporte comme étapes intermédiaires le nitrite, l'oxyde nitrique et l'oxyde nitreux :



Chaque réaction est l'œuvre d'un enzyme spécifique. Les réactions 1, 2, 3, 4 et 5 sont catalysées respectivement par les nitrate-, nitrite-, oxyde nitrique- et oxyde nitreux-réductases.

La nitrate-réductase A a été solubilisée et purifiée [22]; il s'agit d'une molybdo-ferroprotéine non héminique. Son mécanisme d'action est encore mal connu, mais le molybdène joue un rôle essentiel dans la réaction. Une nitrate-réductase B a également été mise en évidence [24]; l'enzyme est soluble, n'utilise pas le chlorate comme substrat et ce composé inhibe son activité. Mais elle n'a encore jamais été purifiée. Selon

l'organisme, la nitrite-réductase est, soit une hémoprotéine possédant 2 hèmes de type *c* et *d* [25] soit une cuprotéine [26]; ces deux enzymes sont solubles. L'oxyde nitrique-réductase est mal connue; elle serait soluble chez *P. perfectomarinus* [23] et particulière chez *Alcaligenes faecalis* [25] dont le cytochrome *cd* présente également une activité oxyde nitrique-réductase. L'oxyde nitreux-réductase, enfin, n'a jamais pu être extraite des cellules sous une forme active; seuls Payne et ses collaborateurs [23] ont pu purifier partiellement une fraction provenant d'un extrait de *P. perfectomarinus* et mesurer une faible activité oxyde nitreux-réductase.

A de très rares exceptions près, les bactéries dénitrifiantes sont incapables de faire fermenter les sucres et ne peuvent croître, en anaérobiose, qu'en présence de NO_3^- , NO_2^- , ou N_2O . Aucune d'entre elles n'est anaérobie stricte. En aérobiose, la dénitrification ne se produit pas car l'oxygène réprime la biosynthèse et inhibe le fonctionnement de plusieurs enzymes [27].

Nous avons tout d'abord voulu confirmer la séquence des produits de la dénitrification établie chez plusieurs bactéries en l'étudiant chez deux organismes isolés dans des sols de rizière du Sénégal. Ces deux études ont été effectuées sur des cellules entières et des extraits non purifiés, à l'aide du respiromètre de Warburg et de la chromatographie en phase gazeuse.

2.2. ÉTUDE DE LA SÉQUENCE DES PRODUITS DE LA DÉNITRIFICATION

2.2.1. *Thiobacillus denitrificans* RT

L'étude de cette bactérie sulfo-oxydante chimio-lithotrophe a été réalisée en collaboration avec Baldensperger qui l'a isolée [28]. Elle se distingue de la plupart des autres souches de cette espèce par la faculté d'assimiler le nitrate. En présence de thiosulfate comme donneur d'électrons, les cellules issues d'une culture anaérobie avec nitrate réduisent le nitrate en N_2 sans accumulation d'intermédiaire. Le nitrite est réduit en $\text{NO} + \text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ vraisemblablement par suite de l'effet inhibiteur du nitrite sur les enzymes des étapes suivantes du processus. La nitrate-réductase est de type A; elle est également synthétisée en aérobiose et en l'absence de nitrate. Les extraits réduisent le nitrite en N_2 en présence de p-phénylène diamine et diméthyl-p-phénylène diamine, en $\text{NO} + \text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$ en présence de tétraméthyl-p-phénylène diamine et en $\text{NO} + \text{N}_2\text{O}$ en présence de phénazine-méthosulfate réduit par l'ascorbate de sodium.

En présence d'oxyde nitrique, les cellules produisent de l'oxyde nitreux et de l'azote avec le thiosulfate comme donneur d'électrons, N_2 constituant le produit

final de la réaction. NO est réduit en N_2O par les extraits en utilisant le système PMS-ascorbate. Les cellules réduisent l'oxyde nitreux en azote en présence de thiosulfate mais il n'a pas été possible de mesurer une activité oxyde nitreux-réductase dans les extraits. Un schéma des mécanismes possibles de la dénitrification a été proposé.

2.2.2. *Bacillus thermodenitrificans*

Pour cette bactérie, toutes les activités ont été mesurées à 60° [29]. Les extraits provenant de cultures anaérobies avec nitrate possèdent la nitrate-réductase dissimilatrice de type A; dans les extraits provenant de cultures aérobies sans nitrate, on trouve les nitrate-réductases de type A et B avec un niveau de base élevé car les cultures étant réalisées à 55°, la teneur en oxygène du milieu est assez faible, la solubilité de ce gaz étant réduite à température élevée.

L'activité nitrite-réductase a été mesurée en utilisant l'extrait de levure à concentration élevée comme donneur d'électrons. L'extrait de levure est un donneur d'électrons aussi efficace que le lactate de sodium pour l'oxyde nitrique-réductase. L'oxyde nitreux-réductase a été dosée en présence du mélange FAD, FMN et NADH préconisé par Payne [23]; elle se trouve solidaire de particules de taille élevée puisque l'activité sédimente à 5 000 g. L'emploi de l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de N_2O a permis de montrer, à l'aide de cellules entières et d'extraits que ce composé constitue une étape intermédiaire entre NO et N_2 chez cette bactérie.

2.3. RECHERCHE DE LA MICROFLORE DÉNITRIFIANTE DES SOLS DE RIZIÈRE DU SÉNÉGAL

Certaines bactéries dénitrifiantes étant capables d'utiliser des concentrations élevées de nitrite [30], il était intéressant de rechercher les microorganismes ayant cette propriété dans les sols de rizière du Sénégal.

2.3.1. Mise en évidence de bactéries tolérant des concentrations élevées de nitrite

Les bactéries dénitrifiantes mésophiles dénombrées en milieu de base au nitrite (D_2) contenant 1 g/l d'extrait de levure, dans des sols de rizière conservés à l'état sec sont beaucoup plus nombreuses que celles dénombrées sur même milieu au nitrate (D_1); le rapport D_2/D_1 est dans tous les cas nettement supérieur à 1 [31]. Dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R) fraîchement prélevés et non séchés on observe, par contre, une prédominance des bactéries dénombrées sur nitrate (D_1); le rapport D_2/D_1 est le plus souvent

inférieur à 1. Les bactéries sporulées étant prédominantes dans les sols conservés à l'état sec, ce sont donc essentiellement ces microorganismes qui sont responsables de la tolérance envers le nitrite.

Si l'on ajoute aux milieux précédents 4 g d'extrait de levure et 20 g de Biotrypcase par l, on observe une augmentation des valeurs des ensembles D_1 et D_2 , le premier augmentant moins que le second, que les sols soient fraîchement prélevés ou conservés à l'état sec [31]. Il existe donc dans les sols de rizière du Sénégal des bactéries dénitrifiantes qui tolèrent des concentrations en nitrite élevées. Ces bactéries représentent une fraction importante de la microflore dénitrifiante totale et leur densité est beaucoup plus élevée lorsqu'elle est déterminée à partir d'un milieu riche.

Des isolements effectués dans tous les sols étudiés, en milieu riche au nitrite (5 g/l) ont permis d'obtenir 44 souches pures dont 73 % sont sporulées. Cette population est très diversifiée puisqu'on y rencontre des germes nitrito-dépendants incapables de réduire NO_3^- , des germes oxyde nitrique-tolérants qui croissent en présence de 10 % de NO et des germes incapables de croître en présence de N_2O . Des études de croissance à l'aide d'un biophotomètre ont montré que la tolérance envers le nitrite varie suivant les souches et que l'on peut distinguer des bactéries nitrito-fortement tolérantes qui croissent rapidement en présence de 5 g/l de KNO_3 et des bactéries nitrito-faiblement tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l [31].

Les bactéries dénitrifiantes thermophiles sont relativement nombreuses dans certains sols de rizière. La numération en présence de nitrite donne des valeurs plus élevées que la numération en présence de nitrate [31]. 45 souches pures ont été isolées sur nitrate ou nitrite à 5 g/l; les premières croissent également en présence de nitrite à 5 g/l. Ces bactéries sont toutes sporulées. Des mesures de l'activité dénitrifiante des cellules de microorganismes aussi bien mésophiles que thermophiles ont montré qu'en général, les cellules cultivées en anaérobiose avaient une activité nettement plus grande lorsqu'elles provenaient d'un milieu au nitrite que lorsqu'elles provenaient d'un milieu au nitrate.

2.3.2. Étude systématique de souches pures isolées

Bactéries mésophiles

Quinze souches pures ont été étudiées en étroite collaboration avec Pichinoty [32]. Ces bactéries se présentent sous la forme de bâtonnets à gram variable, immobiles ou faiblement mobiles avec le plus souvent quelques flagelles latéraux. Les spores sont elliptiques et déformantes. Ces organismes appartiennent donc au groupe II du genre *Bacillus*.

Les 15 souches dénitrifient NO_3^- et NO_2^- , donnant une réaction positive au test à l'oxydase, ont un cytochrome c, la catalase, l'alanine-déshydrogénase, la nitrite-réductase respiratoire qui semble être particulière et une nitrate-réductase dissimilatrice particulière comme l'enzyme A mais d'un type particulier (elle n'utilise pas le chlorate comme substrat et n'est pas inhibée par ce composé). L'une des souches possède cependant l'enzyme A. Aucune d'elles ne croît à 45° et n'utilise le tétrathionate ou le fumarate comme accepteurs d'électrons. Cependant ce groupe comporte des caractères variables. La tolérance à l'égard du nitrite peut atteindre 35 g/l de KNO_2 . Neuf souches font fermenter plus ou moins vigoureusement le glucose. Trois souches sont incapables de croître, en anaérobiose, en présence de N_2O . Huit souches croissent sous une atmosphère contenant 10 % de NO et 90 % de N_2 . Trois souches produisent un pigment brun sur tyrosine et aucune ne produit du poly- β -hydroxybutyrate.

La moyenne du G + C % de leur ADN est de 40,5 \pm 0,9. Ces bactéries diffèrent nettement de *B. azotoformans* isolé par Pichinoty [33] et de *B. brevis* espèce non dénitrifiante la plus proche du groupe étudié. En utilisant l'acétylène pour inhiber la réduction de N_2O en N_2 , nous avons pu montrer avec une suspension cellulaire de l'une de ces souches, que l'oxyde nitreux est un composé intermédiaire dans la réduction du nitrate, du nitrite et de l'oxyde nitrique en N_2 .

Bactéries thermophiles

Quarante cinq souches dénitrifiantes thermophiles ont été isolées dans des sols de rizière du Sénégal, en milieu riche contenant du nitrate ou du nitrite (5 g/l). Une série de tests biochimiques appliqués à l'ensemble des souches a permis d'aboutir à des résultats qui ne concordent pas avec la classification de l'espèce *B. stearothermophilus* de Wolf et Barker [34].

En effet, ces auteurs ont scindé l'espèce en trois groupes : les bactéries du groupe 1 croissent sur NaCl à 3 % ; les bactéries du groupe 2 réduisent le nitrate et le nitrite en gaz (*B. thermodenitrificans*), les bactéries du groupe 3 produisent de l'acide en anaérobiose à partir du lactose. Or, parmi nos 45 souches qui devraient appartenir au groupe 2 des dénitrifiantes, 31 sont capables de croître sur NaCl à 3 % et 5 produisent de l'acide en anaérobiose à partir du lactose. D'autre part, selon de Barjac et Bonnefoi [35], *B. stearothermophilus* ne pousserait pas sur gélose à pH 6 et serait incapable de produire de l'acéthyl méthyl carbinol (AMC). Or absolument toutes nos souches ont poussé sur gélose nutritive à pH 6 et 4 d'entre elles ont produit de l'AMC. Toutes les souches sont indole-négatives et donnent une réaction positive au test à l'oxydase.

2.4. ÉTUDE DE LA DÉNITRIFICATION CHEZ DIVERS ORGANISMES

L'aptitude à dénitrifier est un caractère multienzymatique ayant une signification taxonomique importante. Une vingtaine d'espèces seulement ont été reconnues la possédant; ces espèces sont anaérobies facultatives et pour la plupart non sporulées et à gram négatif. Les bactéries dénitrifiantes chimio-organotrophes appartiennent principalement aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* et *Bacillus*. Dans le passé, les bactéries dénitrifiantes avaient toujours été isolées du sol par culture d'enrichissement, en anaérobiose, dans un milieu minimal ou complexe contenant KNO_3 . Or nous avons vu que les bactéries dénitrifiantes dites nitrito-dépendantes sont dépourvues de nitrate-réductase et ne peuvent être isolées en présence de nitrate. D'autre part l'accumulation de nitrite est toxique pour certains germes. Ces considérations nous ont conduit en collaboration avec Pichinoty, à effectuer également des cultures d'enrichissement à partir de N_2O . Ce dernier présente par ailleurs les avantages suivants : ce gaz existe dans le commerce à l'état pur, il est totalement dépourvu de toxicité et sa solubilité dans l'eau est très grande. C'est ainsi qu'ont pu être isolées plusieurs espèces bactériennes nouvelles ou des souches dénitrifiantes d'espèces connues (*Agrobacterium*, *Flavobacterium*).

La participation d'espèces non identifiées du genre *Bacillus* au processus de dénitrification dans les sols avait été mise en évidence [2]. Nous avons pu confirmer cette participation dans les sols de rizière du Sénégal en isolant toute une série de nouvelles souches [31]. Pichinoty, de son côté, a pu isoler après pasteurisation d'échantillons de sols de la région provençale 17 souches d'une nouvelle bactérie sporulée mésophile qu'il a dénommée *B. azotoformans* [33]. L'organisme se présente sous la forme de bâtonnets à gram négatif, mobiles, à spore elliptique et déformante; il exige de nombreux facteurs de croissance, ne fait pas fermenter le glucose et ne croît, en anaérobiose, qu'en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , tétrathionate ou fumarate. Le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitrique sont réduits en N_2O et N_2 et l'oxyde nitreux en N_2 . La teneur en guanine + cytosine de l'ADN est proche de 39 %.

B. licheniformis est l'une des bactéries dénitrifiantes les plus anciennement connues. Elle est gram-positif et présente des spores ovales non déformantes. Nous avons réévalué avec Pichinoty, le pouvoir dénitrifiant de cet organisme par l'emploi de techniques modernes telles que la chromatographie en phase gazeuse et la recherche des enzymogrammes dans les extraits. Au total 15 souches ont été examinées; deux d'entre elles avaient été récemment isolées du sol. Les 15 souches croissent,

en anaérobiose, dans un milieu peptoné contenant NO_3^- , mais ne croissent pas dans les mêmes conditions si l'on remplace le nitrate par le nitrite ou le N_2O [36]. Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies en milieu au nitrate réduisent rapidement NO en N_2O , mais ne réduisent pas (ou réduisent très lentement) N_2O en N_2 . La production de N_2O et N_2 à partir de NO_3^- ou NO_2^- est nulle ou négligeable. Les extraits des mêmes cellules contiennent la nitrate-réductase A à un niveau élevé; mais leur activité nitrite-réductase est nulle ou négligeable.

Après 8 jours d'incubation à 32° ou 40°, on observe fréquemment un dégagement gazeux dans des tubes de bouillon nutritif DIFCO additionné de glycérol ou de glucose et de NO_3^- . Le dégagement est observé grâce à une clochette renversée. Le gaz produit est probablement de l'azote puisqu'il n'est pas absorbé par KOH. Cette dénitrification avait déjà été signalée par Verhoeven en 1952 [37], mais son mécanisme demeure inconnu. Une réaction chimique de type Van Slyke entre l'acide nitreux et les groupes $-\text{NH}_2$ des acides aminés paraît peu probable puisqu'elle exigerait un pH acide; or, au contraire, le milieu s'alcalinise au cours de la croissance.

2.4.1. *Pseudomonas*

De nombreuses espèces de ce genre dénitrifiant : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* (biotypes B, C, D et F), *P. pseudomallei*, *P. mallei* [38], *P. stutzeri*-*P. stanieri*, *P. mendocina*, *P. caryophylli* [39], *P. solanacearum* (biotypes 3 et 4) [40], *P. perfectumarinus* [41], *P. nautica* [42].

Une étude de 14 souches de *P. stutzeri* isolées à partir de divers types de sol, a confirmé la variabilité bien connue des bactéries appartenant à ce groupe. Toutes ces souches ont la nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire [43].

Une bactérie apparentée à *P. lemoignei* a été isolée par Pichinoty à partir d'un sol anoxique dans un milieu minimal contenant du succinate [44]. Elle se présente sous la forme de petits bâtonnets légèrement incurvés, à gram négatif, non sporulés et immobiles. Cependant des clones mobiles possédant un seul flagelle polaire ont pu être isolés à partir du parent immobile. L'organisme croît seulement en présence de l'un des accepteurs d'électrons suivants : NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ et O_2 . Il n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et utilise seulement quelques alcools et acides organiques comme source de carbone et d'énergie. L'ADN contient 62,2 % de G + C. La bactérie réduit le nitrate et le nitrite avec une faible production de gaz mais dénitrifie vigoureusement l'oxyde nitrique. Bien qu'apparentée à *P. lemoignei*, elle s'en différencie par plusieurs caractères importants, dont le pouvoir

dénitrifiant et un G + C % nettement plus élevé. Il s'agit probablement d'une espèce nouvelle mais nous n'avons jamais réussi à la réisoler.

Une bactérie dénitrifiante apparentée à *P. pickettii* a été isolée du sol d'une rizière de la vallée du Fleuve Sénégal par enrichissement dans un milieu minimal contenant du succinate [45]. Les cellules ont la forme de petits bâtonnets à gram négatif, non sporulés, mobiles grâce à un ou deux flagelles polaires. Leur métabolisme est obligatoirement respiratoire et elles croissent en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O ou O_2 . Cet organisme n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et peut utiliser en condition aérobie comme source de carbone et d'énergie 80 substrats différents. La nitrate-réductase B et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. L'ADN contient 64,3 % de G + C. L'organisme s'apparente étroitement à *P. pickettii* mais s'en différencie par 16 caractères distincts. Ce dernier organisme n'a été isolé qu'à partir de spécimens cliniques.

2.4.2. *Alcaligenes*

Le genre *Alcaligenes* regroupe toutes les bactéries qui se présentent sous la forme de petits bâtonnets, à gram négatif, non sporulés, mobiles grâce à des flagelles péritriches, n'ayant pas d'activité fermentaire et dont le G + C % est compris entre 58 et 70. Au mode de flagellation près, cette définition est celle du genre *Pseudomonas*. Nous avons étudié la dénitrification chez une bactérie isolée par Pichinoty d'une terre de jardin par culture d'enrichissement dans un milieu minimal liquide contenant du L-malate de sodium [46]. La nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. Les suspensions cellulaires provenant de cultures anaérobies en milieu complexe contenant NO_3^- ou N_2O , réduisent NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 sans accumuler NO ; elles produisent aussi N_2O à partir de NO et réduisent quantitativement N_2O en N_2 . La teneur en G + C de l'ADN est de 66 %.

2.4.3. *Flavobacterium*

Cette bactérie a été isolée du sol par Pichinoty par culture d'enrichissement dans un milieu contenant de l'extrait de levure [47]. Les cellules sont de petits bâtonnets, à gram négatif, non sporulés et non mobiles. Les colonies prennent une coloration jaune vif après exposition prolongée à la lumière; cette coloration est due à la production d'un pigment caroténoïde. L'organisme ne présente pas d'activité fermentaire et croît en présence de NO_3^- , N_2O ou O_2 . Il ne réduit pas le nitrate; il s'agit donc d'une bactérie dénitrifiante nitrito-dépendante. Elle n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et utilise seulement des hydra-

tes de carbone comme source de carbone et d'énergie. L'ADN contient 40,8 % de G + C. Bien qu'il présente les caractères physiologiques d'une pseudomonade, cet organisme a été placé dans le genre *Flavobacterium* en raison de sa pigmentation et sa faible teneur en G + C.

2.4.4. *Agrobacterium*

Quatre souches dénitrifiantes appartenant aux espèces *A. radiobacter* et *A. tumefaciens*, isolées du sol ou provenant de collections ont été étudiées [48]. Les organismes se présentent sous la forme de petits bâtonnets, à gram négatif, dépourvus de capsule, non sporulés. Certains sont mobiles grâce à des flagelles péritriches peu nombreux, d'autres sont immobiles. Ces souches sont chimio-organotrophes et n'exigent aucun facteur de croissance. Leur métabolisme est toujours respiratoire. Deux souches utilisent, en anaérobiose, le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux comme accepteurs d'électrons. Les deux autres souches croissent, en anaérobiose, en présence de NO_3^- ou de NO_2^- mais n'utilisent pas N_2O . La seule nitrate-réductase présente est de type B. Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- réduisent NO_3^- , NO_2^- et NO en N_2O ; deux des souches réduisent aussi N_2O en N_2 . Les teneurs en G + C de l'ADN restent comprises entre 58 et 59,2 %. Le travail de Pichinoty confirme les conclusions des autres auteurs : *A. radiobacter* ne peut pas être distingué biochimiquement de *A. tumefaciens*; la seconde espèce peut être considérée comme une variété pathogène de la première.

2.4.5. *Paracoccus*

Six souches de *P. denitrificans* provenant d'une collection ou isolées du sol par culture d'enrichissement ont été étudiées [49]. Elles se présentent sous la forme de cocci non sporulés, à gram négatif mais forment cependant des bâtonnets dans les cultures jeunes. Elles sont prototrophes et croissent, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . Elles synthétisent la nitrate-réductase respiratoire A. L'activité oxyde nitreux-réductase des suspensions cellulaires est particulièrement élevée. La teneur en G + C de l'ADN a une valeur moyenne de $66,2 \pm 1,5$ %. Actuellement, le genre *Micrococcus* auquel était autrefois rattachée l'espèce étudiée, comprend uniquement des espèces à gram positif [50]. *P. denitrificans* ne peut d'autre part être rattaché aux cocci aérobies à gram négatif du genre *Neisseria*, en raison de sa nutrition carbonnée, de sa physiologie et de la composition en bases de son ADN. C'est la raison pour laquelle a été créé le nouveau genre *Paracoccus* [51]. Il apparaît clairement que les genres *Paracoccus*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes* présentent entre eux d'étroits liens de parenté [52].

Il résulte de cette étude microbiologique que nous connaissons maintenant des bactéries dénitrifiantes qui tolèrent des concentrations élevées de nitrite, qui croissent en présence d'oxyde nitrique comme substrat respiratoire, qui font fermenter le glucose et qui appartiennent au genre *Bacillus*. Il convient également de signaler l'existence de bactéries fixatrices d'azote appartenant à l'espèce *Azospirillum lipoferum* capables de dénitrifier le nitrate [53].

Enfin, il apparaît que, contrairement à ce que l'on pensait jusqu'à présent, la nitrate-réductase de type A ne soit pas le seul enzyme en cause dans la réduction dissimilatrice du nitrate par les bactéries dénitrifiantes, puisqu'on rencontre parfois l'enzyme B ou l'enzyme X de certains *Bacillus* isolés des sols de rizière du Sénégal.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM le 15 juin 1978.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GARCIA (J.-L.), 1975. — La dénitrification dans les sols. *Bull. Inst. Pasteur*, 73 : 167-193.
- [2] WOLDENDORP (J.W.), 1963. — The influence of living plants on denitrification. *Meded. Landbouwsch. Wageningen*, 63 : 1-100.
- [3] TUSNEEM (M.E.), PATRICK (W.H.Jr), 1971. — Nitrogen transformations in waterlogged soil. *Louisiana State Univ. Agric. Expt. Sta. Bull.*, 657 : 1-75.
- [4] GARCIA (J.-L.), RAIMBAULT (M.), JACQ (V.), RINAUDO (G.), ROGER (P.), 1974. — Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 11 : 169-185.
- [5] KLUYVER (A.J.), 1953. — Some aspects of nitrate reduction, in « *Microbial Metabolism* », symposium, Rome, 1953 : 71-91.
- [6] GARCIA (J.-L.), 1973. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizière du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 124 B : 351-362.
- [7] GARCIA (J.-L.), 1976. — Production d'oxyde nitrique dans les sols de rizière. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127 A : 401-414.
- [8] GARCIA (J.-L.), 1974. — Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 6 : 79-84.
- [9] GARCIA (J.-L.), 1977. — Evaluation de la dénitrification par la mesure de l'activité oxyde nitreux-réductase. Etude complémentaire. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 89-95.

- [10] GARCIA (J.-L.), 1975. — Evaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 251-256.
- [11] GARCIA (J.-L.), 1977. — La dénitrification en sol de rizière : influence de la nature et du mode d'épandage des engrais azotés. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 83-87.
- [12] I.R.R.I., 1974. — Research Highlights, p. 25.
- [13] GARCIA (J.-L.), 1973. — Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal. *Oecol. Plant.*, 8 : 315-323.
- [14] GARCIA (J.-L.), 1975. — Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 139-141.
- [15] RAIMBAULT (M.), RINAUDO (G.), GARCIA (J.-L.), BOUREAU (M.), 1977. — A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 9 : 193-196.
- [16] JOHN (P.), WHATLEY (F.R.), 1970. — Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 216 : 342-352.
- [17] MIYATA (M.), MORI (T.), 1969. — Studies on Denitrification. X. The "denitrifying enzyme" as a nitrite reductase and the electron donating system for denitrification. *J. Biochem. (Tokyo)*, 66 : 463-471.
- [18] MIYATA (M.), 1971. — Studies on denitrification. XIV. The electron donating system in the reduction of nitric oxide and nitrate. *J. Biochem. (Tokyo)*, 70 : 205-213.
- [19] MATSUBARA (T.), 1975. — The participation of cytochromes in the reduction of N_2O to N_2 by a denitrifying bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)*, 77 : 627-632.
- [20] OHNISHI (T.), MORI (T.), 1960. — Oxidative phosphorylation coupled with denitrification in intact cell systems. *J. Biochem. (Tokyo)*, 48 : 406-411.
- [21] FORGET (P.), PICHINOTY (F.), 1965. — Le cycle tricarboxylique chez une bactérie dénitrifiante obligatoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 108 : 364-377.
- [22] FORGET (P.), 1971. — Les nitrate-réductases bactériennes. Solubilisation, purification et propriétés de l'enzyme A de *Micrococcus denitrificans*. *Europ. J. Biochem.*, 18 : 442-450.
- [23] PAYNE (W.J.), RILEY (P.S.), COK (C.D.Jr), 1971. — Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bact.*, 106 : 356-361.
- [24] PICHINOTY (F.), PIECHAUD (M.), 1968. — Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 114 : 77-98.
- [25] MATSUBARA (T.), IWASAKI (H.), 1972. — Nitric oxide-reducing activity of *Alcaligenes faecalis* cytochrome cd. *J. Biochem. (Tokyo)*, 72 : 57-64.
- [26] SUZUKI (H.), IWASAKI (H.), 1962. — Studies on denitrification. VI. Preparations and properties of crystalline blue protein and cryptocytochrome c, and role of copper in denitrifying enzyme from a denitrifying bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)*, 52 : 193-199.
- [27] PICHINOTY (F.), 1973. — La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur*, 71 : 317-395.
- [28] BALDENSPERGER (J.), GARCIA (J.-L.), 1975. — Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 103 : 31-36.
- [29] GARCIA (J.-L.), 1977. — Etude de la dénitrification chez une bactérie thermophile sporulée. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 A : 447-458.
- [30] VANGNAI (S.), KLEIN (D.A.), 1974. — A study of nitrite-dependant dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil Biol. Biochem.*, 6 : 335-339.
- [31] GARCIA (J.-L.), 1977. — Analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 A : 433-446.
- [32] PICHINOTY (F.), GARCIA (J.-L.), MANDEL (M.), JOB (C.), DURAND (M.), 1978. — Isolement de bactéries utilisant en anaérobiose l'oxyde nitrique comme accepteur d'électrons respiratoire. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, sér. D, 286, 1403-1405.
- [33] PICHINOTY (F.), DE BARJAC (H.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1976. — Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : *Bacillus azotoformans* n.sp. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127 B : 351-361.
- [34] WOLF (J.), BARKER (A.N.), 1968. — The genus *Bacillus* : aids to the identification of its species. In "Identification Method For Microbiologists" (B.M. Gibbs & D.A. Shapton, eds.), part. B, p. 93-109, Academic Press, London.
- [35] BARJAC (H. DE), BONNEFOI (A.), 1972. — Essai de classification biochimique de soixante-quatre « *Bacillus* » des groupes II et III, représentant onze espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 122 : 463-473.
- [36] PICHINOTY (F.), GARCIA (J.-L.), JOB (C.), DURAND (M.), 1978. — La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 45-55.

- [37] VERHOEVEN (W.), 1952. — Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. Thesis, Uitgeverij Waltman, Delft.
- [38] STANIER (R.Y.), PALLERONI (N.J.), DOUDOROFF (M.), 1966. — The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 159-271.
- [39] PALLERONI (N.J.), DOUDOROFF (M.), STANIER (R.Y.), SOLANES (R.E.), MANDEL (M.), 1970. — Taxonomy of the aerobic pseudomonas : the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. Gen. Microbiol.*, 60 : 215-231.
- [40] HAYWARD (A.C.), 1964. — Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bact.*, 27 : 265-277.
- [41] RHODES (M.), BEST (A.), PAYNE (W.J.), 1963. — Electron donors and cofactors for denitrification by *Pseudomonas perfectomarinus*. *Canad. J. Microbiol.*, 9 : 799-807.
- [42] BAUMANN (L.), BAUMANN (P.), MANDEL (M.), ALLEN (R.D.), 1972. — Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bact.*, 110 : 402-429.
- [43] PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1977. — Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe *Pseudomonas stutzeri* isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 128 A : 75-87.
- [44] PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1977. — The isolation and properties of a denitrifying bacterium related to *Pseudomonas lemoignei*. *Int. J. Syst. Bact.*, 27 : 346-348.
- [45] GARCIA (J.-L.), PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), 1977. — A new denitrifying saprophyte related to *Pseudomonas pickettii*. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 128 A : 229-237.
- [46] PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1975. — Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre *Alcaligenes*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, Sér. D, 281 : 1273-1275.
- [47] PICHINOTY (F.), BIGLIARDI-ROUVIER (J.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), METENIER (G.), GARCIA (J.-L.), 1976. — The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42 : 349-354.
- [48] PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GARCIA (J.-L.), 1977. — Etude de six souches de *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium radiobacter*. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 128 A : 303-310.
- [49] PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GARCIA (J.-L.), 1977. — Etude de six souches de *Paracoccus denitrificans*. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 128 B : 243-251.
- [50] BAIRD-PARKER (A.C.), 1965. — The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. *J. Gen. Microbiol.*, 38 : 363-387.
- [51] DAVIS (D.H.), DOUDOROFF (M.), STANIER (R.Y.), 1969. — Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas* : Taxonomic implications. *Int. J. Syst. Bact.*, 19 : 375-390.
- [52] DOUDOROFF (M.), 1974. — Genus *Paracoccus* Davis, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth ed. (R.E. Buchanan & N.E. Gibbons eds), p. 438-440. The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- [53] NEYRA (C.A.), DOBEREINER (J.), LALANDE (R.), KNOWLES (R.), 1977. — Denitrification by N_2 -fixing *Spirillum lipoferum*. *Canad. J. Microbiol.*, 23 : 300-305.