

MICROBIOLOGIE. — *Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre Alcaligenes.* Note (*) de MM. **Francis Pichinoty, Manley Mandel, Bruce Greenway et Jean-Louis Garcia**, transmise par M. Roger Buvat.

L'organisme isolé est un petit bâtonnet non sporulé, Gram-négatif, mobile par les moyens de flagelles péritriches. Il est chimio-organotrophe, oxydase-positif, et utilise O_2 , NO_3^- , NO_2^- et N_2O comme substrats respiratoires. Des alcools primaires, de nombreux acides organiques et acides aminés sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie. Les hydrates de carbone ne sont pas assimilés. Les cellules accumulent du poly- β -hydroxybutyrate. La bactérie appartient au genre *Alcaligenes* et ses caractères phénotypiques sont comparés à ceux d'*A. faecalis*.

La bactérie décrite dans la présente Note a été isolée de la terre de jardin par culture d'enrichissement dans un milieu minimal liquide contenant 4 g/litre de L-malate de sodium, en ballons remplis de N_2O . Ce milieu est tamponné à pH 7 et ne contient pas de nitrate (¹). La température d'incubation était de 32 °C. Après plusieurs passages, un isolement a été effectué sur ce même milieu solidifié par l'addition d'agar. Les boîtes étaient placées en incubation aérobie, à 32 °C, pendant 24 à 48 h. Après plusieurs étalements successifs, la pureté de la culture a été vérifiée. La bactérie ainsi isolée est entretenue sur gélose nutritive.

La plupart des tests employés au cours de l'étude des caractères biochimiques et physiologiques ont été décrits par Stanier, Palleroni et Doudoroff (²). L'assimilation des aliments carbonés a été étudiée en milieu liquide à 32 °C. La croissance était estimée visuellement après 7 jours d'incubation. Les nitrate-réductases A et B ont été recherchées dans les extraits par une technique manométrique (¹). La nitrite-réductase respiratoire a été mise en évidence dans les extraits par la production de NO en présence de N : N : N' : N'-tétraméthyl-*p*-phénylène-diamine comme source d'électrons (³). Les gaz formés au cours de la réduction de NO_3^- , NO_2^- , NO et N_2O en présence de succinate par les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies, ont été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (⁴). L'acide poly- β -hydroxybutyrique a été identifié cytologiquement par coloration au noir Soudan et chimiquement par extraction au chloroforme bouillant et conversion en acide crotonique en présence de H_2SO_4 concentré à 100 °C (⁵).

1. MORPHOLOGIE. — Bâtonnets Gram-négatifs. Largeur des cellules, 0,5 à 0,7 μm ; longueur, 1,2 à 2,2 μm . Multiplication par fission binaire. Absence de spores. Mobile par les moyens de flagelles péritriches ; chaque cellule en comporte une dizaine en moyenne. Absence de capsule. Colonies convexes, circulaires, lisses, mi-translucides, non pigmentées, avec marge entière, pouvant atteindre 5 mm de diamètre sur agar nutritif.

2. CULTURE ET CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES. — Chimio-organotrophe obligatoire incapable de croître en milieu minéral liquide sous une atmosphère contenant H_2 , O_2 (ou N_2O) et CO_2 . N'exige aucun facteur de croissance. Métabolisme respi-

26 AOUT 1977

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° M 8643 Bio. Sols
CR

ratoire obligatoire. Utilise O_2 , NO_3^- , NO_2^- et N_2O comme substrats respiratoires. Croissance rapide, dense et homogène en bouillon nutritif. Ne croît ni à $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ni à $+40\text{ }^\circ\text{C}$. Croît en bouillon à pH 9. Croît en présence de 6 % de NaCl. Accumule du poly- β -hydroxybutyrate comme réserve carbonée intracellulaire.

Les composés suivants sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie : D-gluconate, D-saccharate, glycérol, glycérate, éthanol, propanol, butanol, acétate, butyrate, valérate, caprate, succinate, glutarate, adipate, pimélate, subérate, azélaïdate, sébacate, citrate, DL-isocitrate, L-lactate, D-lactate, β -hydroxy- β -méthylglutarate, L-malate, D-malate, DL-3-hydroxybutyrate, *méso*-tartrate, pyruvate, α -cétooglutarate, fumarate, maléate, itaconate, *cis*-aconitate, mésaconate, citraconate, crotonate, hippurate, *d*-pantothénate, α -L-alanine, α -D-alanine, DL-valine, L-leucine, DL-sérine, DL-aspartate, asparagine, L-glutamate, L-lysine, L-histidine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-proline, acétamide et 4-amino-*n*-butyrate. Aucun des composés suivants n'est utilisé comme source de carbone et d'énergie : D-glucose, L-glucose, D-galactose, L-sorbose, D-mannose, D-fucose, L-fucose, fructose, D-glucosamine, salicine, D-glucuronate, D-xylose, D-arabinose, L-arabinose, L-rhamnose, D-ribose, inosine, lactose, maltose, saccharose, cellobiose, mélibiose, tréhalose, arbutine, D-mélézitose, raffinose, amidon, inuline, 2-céto-D-gluconate, D-mannitol, D-sorbitol, D-dulcitol, *méso*-érythritol, ribitol, D-arabitol, L-arabitol, 1,2-propanediol, 2,3-butanediol, 1,2-éthanediol, isobutanol, méthanol, 2-phényl-éthanol, propionate, isobutyrate, isovalérate, caproate, pélargonate, oxalate, malonate, glycolate, tartronate, *d*-tartrate, *l*-tartrate, mucate, lévulinate, *trans*-aconitate, benzoate, *ortho*-hydroxybenzoate, *para*-hydroxybenzoate, *méta*-hydroxybenzoate, phtalate, L-mandélate, D-mandélate, quinate, téréphtalate, nicotinate, cinnamate, anthranilate, *para*-aminobenzoate, phénylacétate, benzoylformate, kynurénate, naphthalène, testostérone, dodécane, hexadécane, glycine, sarcosine, créatine, bétaïne, β -alanine, DL-*nor*-valine, L-*nor*-leucine, L-isoleucine, DL-thréonine, DL-méthionine, L-arginine, DL-ornithine, L-citrulline, histamine, D-tryptophane, I-aminopentane, éthanolamine, tryptamine, méthylamine, *n*-butylamine, *n*-amylamine, benzylamine, DL-2-amino-*n*-butyrate, putrescine, spermine et géraniol. Le poly- β -hydroxybutyrate extrait de *Bacillus megaterium* et purifié n'est pas assimilé, ce qui indique que l'organisme ne synthétise pas de dépolymérase exocellulaire capable d'hydrolyser ce lipide.

L'organisme est oxydase-positif et possède une catalase. Il synthétise un cytochrome de type *c* dont la forme réduite présente des pics d'absorption α à 552,5 m μ et β à 521 m μ . Aucune production de pigment n'est décelable sur les milieux King A et King B respectivement. La gélatine, l'amidon et le « Tween 80 » ne sont pas hydrolysés. On n'observe pas de production d'indole. La réaction au jaune d'œuf est négative. La L-phénylalanine-désaminase, l'uréase, l'arginine-dihydrolase constitutive et la nitrate-réductase B sont absentes. La nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. L'organisme ne synthétise pas d'hydrogénase lorsqu'il croît en anaérobiose dans un milieu complexe sous une atmosphère contenant H_2 et N_2O . Le lait tournesolé subit une alcalinisation. Le nitrate est utilisé comme source d'azote. L'organisme ne fixe pas N_2 .

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 .

3. GÉNOTYPE. — La teneur en guanine + cytosine de l'ADN, calculée à partir de la densité de flottaison [(⁶), (⁷)], est de 66 %.

4. TAXONOMIE. — La bactérie décrite appartient au genre *Alcaligenes* qui regroupe actuellement tous les bacilles Gram-négatifs, non sporulés, mobiles par les moyens de flagelles péritriches, doués d'un métabolisme respiratoire obligatoire et ayant un G + C % compris entre 57,9 et 70 (⁸). Trois espèces dénitrifiantes : *A. faecalis*, *A. denitrificans* et *A. odorans*, incapables d'assimiler les pentoses et les hexoses, avaient été décrites et caractérisées de façon incomplète. Cependant Hendrie, Holding et Shewan (⁹) ont reconnu la nécessité de n'admettre l'existence que d'une seule espèce qui a reçu le nom d'*A. faecalis*. On retrouve plusieurs caractères biochimiques de la bactérie décrite chez les souches non saccharolytiques d'*Alcaligenes* isolées de spécimens cliniques et caractérisées par Gilardi (¹⁰) : une réaction oxydase-positive ; l'aptitude à assimiler l'acétate, le succinate, le fumarate, le D-malate, le DL-lactate, le citrate, le pyruvate, l'asparagine, le DL-aspartate et le L-glutamate ; l'inaptitude à assimiler le pèlargonate, la L-arginine et la DL-nor-leucine ; l'absence de phénylalanine-désaminase, de lécithinase et de gélatinase. Par contre Gilardi (¹⁰) n'a pas trouvé de poly- β -hydroxybutyrate chez ces bactéries ; mais il n'a pas recherché ce lipide à l'aide de la méthode chimique qui est beaucoup plus sensible et sûre que l'examen cytologique. La plupart des souches d'*A. faecalis* et d'*A. odorans* présentent des G + C % compris entre 56 et 59 [(⁹), (¹¹)]. Certaines d'entre elles ont cependant des teneurs plus élevées comprises entre 64 et 70 % (¹¹). Seule l'étude biochimique approfondie de nombreuses souches de collection permettrait de préciser, au sein du genre *Alcaligenes*, la position taxonomique de la bactérie qui vient d'être décrite. Celle-ci a été déposée à la Collection de l'Institut Pasteur sous le n° CIP 73-75.

(*) Séance du 29 septembre 1975.

- (1) F. PICHINOTY et M. PIÉCHAUD, *Ann. Inst. Pasteur*, 114, 1968, p. 77-98.
- (2) R. Y. STANIER, N. J. PALLERONI et M. DOUDOROFF, *J. gen. Microbiol.*, 43, 1966, p. 159-271.
- (3) M. MIYATA et T. MORI, *J. Biochem.*, Tokyo, 64, 1968, p. 849-861.
- (4) J.-L. GARCIA, *Soil. Biol. Biochem.*, 6, 1974, p. 79-84.
- (5) J. H. LAW et R. A. SLEPECKY, *J. Bacteriol.*, 82, 1961, p. 33-36.
- (6) C. L. SCHILDKRAUT, J. MARMUR et P. DOTY, *J. mol. Biol.*, 4, 1962, p. 430-433.
- (7) M. MANDEL, C. L. SCHILDKRAUT et J. MARMUR, in : *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 12, partie B, 1968, p. 184-195.
- (8) A. J. HOLDING et J. M. SHEWAN, in : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, p. 273-275.
- (9) M. S. HENDRIE, A. J. HOLDING et J. M. SHEWAN, *Int. J. syst. Bacteriol.*, 24, 1974, p. 534-550.
- (10) G. L. GILARDI, *Antonie van Leeuwenhoek*, 39, 1973, p. 229-242.
- (11) J. DE LEY, K. KERSTERS, J. KHAN-MATSUBARA et J. M. SHEWAN, *Antonie van Leeuwenhoek*, 36, 1970, p. 193-207.

F. P., *Laboratoire de Chimie Bactérienne*,
CNRS, 13274 Marseille Cedex 2 ;
M. M., B. G., *The University of Texas*,
M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute,
Houston, Texas, Etats-Unis ;
J.-L. G., *Laboratoire de Microbiologie*,
ORSTOM, Dakar, Sénégal.