

ÉTUDE DE 14 BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES  
APPARTENANT AU GROUPE *PSEUDOMONAS STUTZERI*  
ISOLÉES DU SOL PAR CULTURE D'ENRICHISSEMENT  
EN PRÉSENCE D'OXYDE NITREUX

par F. Pichinoty, M. Mandel, B. Greenway et J.-L. Garcia

Laboratoire de Biochimie Végétale, UER Scientifique de Luminy, Marseille (France),  
The University of Texas, M. D. Anderson Hospital  
and Tumor Institute, Houston, Texas (USA), et Laboratoire de Microbiologie,  
O. R. S. T. O. M., Dakar (Sénégal)

SUMMARY

STUDY OF 14 DENITRIFYING SOIL BACTERIA  
OF THE « *PSEUDOMONAS STUTZERI* » GROUP  
ISOLATED BY ENRICHMENT CULTURE  
IN THE PRESENCE OF NITROUS OXIDE

The strains were isolated from soil by enrichment in a liquid minimal medium containing ethanol, acetate, succinate, L-malate or tartrate, under an N<sub>2</sub>O atmosphere at 32° C.

All fourteen strains can use the following 25 sources of carbon and energy under aerobic conditions: glycerate, ethanol, propanol, acetate, butyrate, malonate, succinate, glutarate, sebacate, glycollate, L-lactate, D-lactate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, pyruvate, fumarate, itaconate, mesaconate, crotonate, L- $\alpha$ -alanine, D- $\alpha$ -alanine, L-leucine, asparagine, L-tyrosine, and L-proline. They hydrolyze Tween 80 but not gelatin. Nitrate is used as nitrogen source. Nitrate reductase A and respiratory nitrite reductase are present.

Four of the strains are clearly and easily distinguishable from the others on the basis of six characters: special morphology of colonies, in ability to use isovalerate and DL-valine, inability to use glucose, absence of exocellular amylase, and high level of metapyrocatechase. Their G + C content is 66-67 %.

One of the strains is distinct from the others by the yellow pigmentation of its colonies, its ability to use D-glucuronate, trehalose, D-sor-

Manuscrit reçu le 24 septembre 1976, accepté le 6 janvier 1977.

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

Collection de Référence

26 JAN 1977  
8644 Bio Sols  
CR

bitol and citraconate, ability to grow at 4° but not at 40°, and a lower G + C content: 63 %.

One strain accumulates poly- $\beta$ -hydroxybutyrate.

This work confirms the well-known, wide variability of the bacteria belonging to the *P. stutzeri* group.

Denitrification by two of the strains was quantitatively studied using cell suspensions. Cells from  $\text{NO}_3^-$ -containing anaerobic cultures reduce  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and NO to  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$ ; they reduce slowly  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$ . Cells grown in anaerobic cultures under  $\text{N}_2\text{O}$  also reduce  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and NO to  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  but they reduce  $\text{N}_2\text{O}$  rapidly to  $\text{N}_2$ .

KEY-WORDS: *Pseudomonas stutzeri*, Soil, Bacterial nutrition; Denitrification, Taxonomy.

---

## INTRODUCTION

*Pseudomonas stutzeri* est sans doute l'une des espèces dénitrifiantes le plus anciennement connues. La description précise qu'en ont donnée van Niel et Allen [15] en 1952 la rend aisément reconnaissable. On l'isole généralement à partir du sol par culture d'enrichissement, en anaérobiose, dans un milieu minimal contenant du nitrate et un aliment carboné simple tel que le tartrate, l'éthanol, l'acétate, le succinate ou le sébacate [8, 14, 15]. Après avoir étudié de façon approfondie un lot de 17 souches issues pour la plupart de spécimens cliniques, Stanier et coll. [13] ont défini un phénotype idéal caractérisé par une flagellation monotriche, le pouvoir dénitrifiant, l'aptitude à utiliser comme sources de carbone et d'énergie le maltose, l'amidon, le propylène-glycol et le glycolate, et l'inaptitude à utiliser le L-arabinose, le D-galactose, le cellobiose, le 2-cétogluconate, le *para*-hydroxybenzoate, la  $\beta$ -alanine et la L-histidine. Par la suite Palleroni et coll. [8] ont isolé 22 souches à partir du sol ou de l'eau et les ont comparées aux 17 souches déjà étudiées. La conclusion qui se dégage de ces recherches est une variabilité nutritionnelle assez exceptionnelle pour une espèce bactérienne. En effet, bien que 29 composés soient utilisés par 90 % ou plus des souches, seuls l'acétate, le succinate, le pyruvate, le lactate et l'éthylène-glycol sont des substrats universels. En outre les analyses faites par Mandel [5] ont révélé que les 17 souches étudiées par Stanier et coll. [13] se répartissent en deux groupes A et B ayant des G + C % différents : groupe A,  $62,1 \pm 1$  ; groupe B,  $65 \pm 1$ . Cet auteur estime qu'il s'agit de deux espèces distinctes, *P. stutzeri* ayant un G + C % de 65, et *P. stanieri* ayant un G + C % de 62. Cependant Palleroni et coll. [8] écartent pour l'instant une telle subdivision spécifique du complexe car les variations de la composition de l'ADN ne correspondent pas à des différences accusées du phénotype.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Microorganismes.*

Les 14 souches ont été isolées par culture d'enrichissement en milieu minimal contenant 4 g/l de l'aliment carboné, placé en incubation sous atmosphère de  $N_2O$ , à 32° C. Le sol anoxique imprégné d'eau se trouve situé en bordure de l'étang de Berre. La terre de jardin provient de la région de Marseille. L'origine de l'échantillon et la nature de la source de carbone sont indiquées entre parenthèses : 1 (sol anoxique, éthanol) ; 2 (sol anoxique, acétate) ; 3 (sol anoxique, éthanol) ; 4 (terre de jardin, éthanol) ; 5 (terre de jardin, succinate) ; 6 (terre de jardin, tartrate) ; 7 (terreau, L-malate) ; 8 (terre de jardin, L-malate) ; 9 (terreau, succinate) ; 10 (terreau, tartrate) ; 11 (terreau, succinate) ; 12 (terreau, L-malate) ; 13 (terreau, L-malate) ; 14 (sol anoxique, L-malate). La souche 220, qui avait déjà été étudiée par Stanier et coll. [13], provient d'un spécimen clinique (souche AB 180. ATCC 17587).

2) *Milieux.*

Le milieu de base utilisé pour la préparation des différents milieux a la composition suivante :

$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ , 3,575 g ;  $KH_2PO_4$ , 0,98 g ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,03 g ;  $NH_4Cl$ , 0,5 g ; solution contenant des oligo-éléments (versène, 50 g ;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2,2 g ;  $CaCl_2$ , 5,54 g ;  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 5,06 g ;  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 4,79 g ;  $NH_4Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , 1,1 g ;  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 1,57 g ;  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ , 1,6 g ;  $H_3BO_3$ , 0,05 g ; eau distillée, 1 000 ml ; le pH est ajusté à 6 avec KOH) 0,2 ml ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 7.

La nutrition a été étudiée en tubes à essais contenant environ 7 ml de milieu. La concentration des aliments carbonés était de 2 g/l. On observe la croissance après 7 jours d'incubation à 32°.

3) *Tests et essais enzymatiques.*

La plupart des tests appliqués au cours de ce travail sont ceux qui avaient été employés par Stanier et coll. [13].

Les nitrates-réductases A et B ont été identifiées dans les extraits enzymatiques par une technique manométrique [9]. Nous avons utilisé des cultures anaérobies contenant 2 g/l de  $KNO_3$ , 2g/l de lactate de sodium et 2 g/l d'extrait de levure, pour la recherche de l'enzyme A, et des cultures aérobies contenant 2 g/l de lactate de sodium et 2 g/l d'extrait de levure, pour la recherche de l'enzyme B. La nitrite-réductase respiratoire a été mise en évidence dans les extraits ayant servi à la recherche de la nitrates-réductase A, par la production de NO, sous atmosphère de  $N_2$ , en présence de tétraméthyl-*p*-phénylène-diamine [7].

Les clivages *ortho* et *méta* du catéchol ont été mis en évidence par la recherche de la pyrocatechase et de la métapyrocatechase [4] dans les extraits enzymatiques. Les cellules provenaient de cultures aérobies contenant 2 g/l d'extrait de levure et 1 g/l de benzoate de sodium. Les clivages *ortho* et *méta* du protocatechuate ont été mis en évidence respectivement par la recherche de la protocatechuate-3, 4-oxygénase [12] et de la coloration jaune provoquée par la formation de la semialdéhyde de l'acide  $\gamma$ -carboxy- $\alpha$ -hydroxymuconique [10] dans les extraits enzymatiques. Les cellules provenaient de cultures aérobies contenant 2 g/l d'extrait de levure et 1 g/l de *para*-hydroxybenzoate de sodium.

Le cytochrome *c* a été identifié par la position de ses bandes  $\alpha$  et  $\beta$  après l'addition d'hydrosulfite de sodium. On prépare les extraits enzymatiques en traitant par les ultrasons les cellules qui proviennent de cultures aérobies contenant 2 g/l de lactate de sodium et 2 g/l d'extrait de levure.

4) *Composition en bases de l'ADN.*

L'ADN a été extrait des cellules cultivées en milieu complexe [5]. La composition en bases a été calculée [11] à partir de la densité de flottaison [6].

5) *Étude de la dénitrification.*

Les cultures ont été réalisées en anaérobiose, à 30°, dans un milieu contenant 5 g/l de succinate de sodium, 1 g/l de bacto-peptone et 1 g/l d'extrait de levure. La concentration de  $\text{KNO}_3$  est de 5 g/l. Les cultures réalisées en présence de  $\text{N}_2\text{O}$  ne contiennent pas de nitrate. Les cellules sont recueillies après 24 h d'incubation et lavées par centrifugation, puis remises en suspension dans du tampon phosphate (0,15 M; pH 7). Les expériences ont été faites chaque fois en deux exemplaires dans des flacons serum de 125 ml contenant : tampon phosphate (0,15 M; pH 7), 3 ml; succinate de sodium (0,25 M), 1 ml; suspension bactérienne, 1 ml;  $\text{KNO}_3$  (0,2 M), 1 ml (ou  $\text{KNO}_2$  (0,2 M), 1 ml; ou  $\text{NO}$ , 5 ml; ou  $\text{N}_2\text{O}$ , 5 ml); eau pour compléter le volume de la phase liquide à 25 ml; phase gazeuse, hélium pur. Les flacons sont agités dans un bain-marie à 37°. Nous avons prélevé 1 ml de gaz à la seringue toutes les heures pendant 4 h et procédé immédiatement à son analyse par chromatographie en phase gazeuse [3]. Les activités spécifiques ont été déduites de la pente des courbes représentant le dégagement ou la consommation de gaz. Elles sont exprimées en  $\mu\text{l}$  (22°; pression atmosphérique) par mg d'azote et par heure. L'azote des cellules a été dosé par micro-Kjeldahl.

## RÉSULTATS

I. — *Caractères morphologiques*

Toutes les souches se présentent sous la forme de petits bâtonnets à Gram négatif, mobiles, dépourvus de capsule, possédant un ou deux flagelles polaires. Les cellules des souches 4, 7, 9 et 10 ont fréquemment deux flagelles à un même pôle. On observe parfois un flagelle latéral de faible longueur d'onde chez la souche 11.

Les souches 1, 2, 3, 5, 8, 10 et 13 donnent sur agar nutritif des colonies rugueuses, plissées, opaques, plutôt brunes, qui sont caractéristiques de *P. stutzeri* (fig. 1). Les colonies de la souche 14 sont légèrement plissées, tandis que celles de la souche 6 sont lisses. La souche 4 donne à la fois des colonies lisses et des colonies rugueuses, pigmentées en jaune. Les colonies des souches 7, 9, 11 et 12 ont un aspect singulier : elles sont circulaires, plissées, opaques en leur centre, translucides à leur périphérie, présentent une protubérance centrale, une marge fine, et elles s'étaient sur une surface étendue (fig. 2).

Les souches 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 produisent un voile à la surface des cultures en bouillon. Les souches 7, 8, 9, 11, 12, 13 et 14 n'en produisent pas.

---

FIG. 1. — Colonies de la souche 1.

FIG. 2. — Colonies de la souche 11.

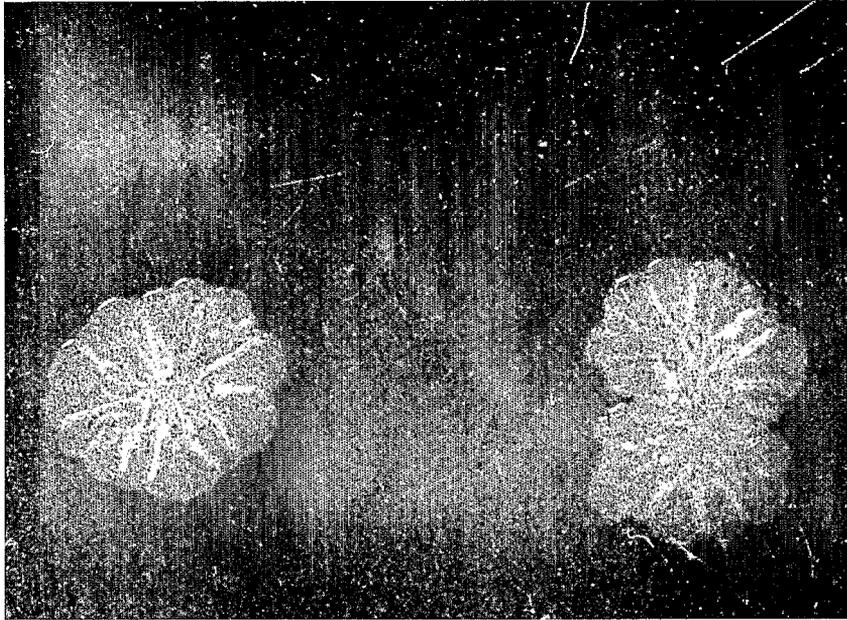


FIG. 1



FIG. 2

II. — *Nutrition carbonée*

Les 25 substrats suivants sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie par les 14 souches isolées du sol : glycérate, éthanol, propanol, acétate, butyrate, malonate, succinate, glutarate, sébacate, glycolate, L-lactate, D-lactate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, pyruvate, fumarate, itaconate, mésoaconate, crotonate,  $\alpha$ -L-alanine,  $\alpha$ -D-alanine, L-leucine, asparagine, L-tyrosine et L-proline. Par contre, la souche 220 n'utilise pas le butyrate, le sébacate, le crotonate, la L-leucine et la L-tyrosine ; mais elle utilise le D-xylose.

Les 89 substrats suivants ne sont pas utilisés comme sources de carbone et d'énergie par les 14 souches isolées du sol : L-glucose, D-galactose, D-fucose, L-fucose,  $\alpha$ -méthyl-D-glucoside,  $\beta$ -méthyl-D-glucoside,  $\alpha$ -méthyl-D-galactoside,  $\beta$ -méthyl-D-galactoside,  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside, salicine, D-saccharate, D-xylose, D-arabinose, L-arabinose, L-rhamnose, D-ribose, inosine,  $\alpha$ -méthyl-D-xyloside,  $\beta$ -méthyl-D-xyloside, D-érythrose, lactose, saccharose, cellobiose, mélibiose, arbutine, D-mélézitose, raffinose, inuline, 2-céto-D-gluconate, D-dulcitol, méso-érythritol, ribitol, L-arabitol, méthanol, 2-phényléthanol, oxalate, adipate, pimélate, tartronate,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -méthylglutarate, *d*-tartrate, *l*-tartrate, méso-tartrate, mucate, lévulinate, *trans*-aconitate, *ortho*-hydroxybenzoate, *méta*-hydroxybenzoate, phtalate, L-mandélate, D-mandélate, quinate, téréphtalate, nicotinate, cinnamate, hippurate, anthranilate, *para*-aminobenzoate, phénylacétate, benzoylformate, kynurénate, naphtalène, dodécane, hexadécane, *d*-pantothénate, sarcosine, créatine, bétaïne, DL-norvaline, L-norleucine, DL-thréonine, DL-méthionine, L-lysine, L-arginine, DL-ornithine, L-citrulline, L-histidine, histamine, L-tryptophane, D-tryptophane, éthanolamine, tryptamine, méthylamine, *n*-butylamine, benzylamine, 4-amino-*n*-butyrate, DL-2-amino-*n*-butyrate, spermine et géranol.

Les substrats qui sont utilisés seulement par une fraction des 15 souches figurent dans le tableau I.

Seules les souches 7, 9, 11 et 12 utilisent l'isovalérate et la DL-valine, et n'utilisent pas le glucose. Seule la souche 4 utilise le D-glucuronate, le tréhalose, le D-sorbitol et le citraconate.

III. — *Caractères biochimiques et physiologiques*

Les 15 souches sont prototrophes, croissent en eau peptonée à pH 9 et en bouillon contenant 3 % de NaCl. A l'exception de la souche 13, elles croissent toutes en bouillon contenant 6 % de NaCl. Aucun pigment n'est produit en milieux King A et King B. Seule la souche 6 présente des inclusions de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate ; celle-ci n'hydrolyse et n'assimile pas ce composé (isolé à partir de *Bacillus megaterium*) lorsqu'il est ajouté au milieu de culture. Toutes les souches assimilent  $\text{NO}_3^-$  et croissent, en anaérobiose, en présence de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{N}_2\text{O}$ . Ces composés sont dénitrifiés avec production de gaz. Elles synthétisent la nitrate-

TABLEAU I. — Substrats utilisés par une fraction des souches.

Substrat	Nb de souches positives	Souches négatives
D-glucose	11	7, 9, 11, 12
L-sorbose	1	Toutes excepté 12
D-mannose	2	Toutes excepté 2 et 3
D-fructose	8	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
D-glucosamine	4	Toutes excepté 1, 2, 3 et 14
D-gluconate	9	5, 6, 8, 10, 13, 220
D-glucuronate	1	Toutes excepté 4
D-xylose	1	Toutes excepté 220
Maltose	8	2, 3, 7, 9, 11, 12, 14
Tréhalose	1	Toutes excepté 4
Amidon	7	1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 14
D-mannitol	2	Toutes excepté 4 et 220
D-sorbitol	1	Toutes excepté 4
D-arabitol	2	Toutes excepté 4 et 220
Glycérol	12	9, 11, 12
1,2-propanediol	11	1, 2, 8, 220
2,3-butenediol	12	1, 2, 4
1,2-éthanediol	9	1, 2, 5, 6, 14, 220
Butanol	2	Toutes excepté 14 et 220
Isobutanol	3	Toutes excepté 3, 7 et 11
Propionate	4	Toutes excepté 1, 2, 3 et 11
Butyrate	14	Toutes excepté 220
Isobutyrate	3	Toutes excepté 9, 11 et 14
Valérate	6	1, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 220
Isovalérate	4	Toutes excepté 7, 9, 11 et 12
Caproate	8	4, 6, 7, 8, 10, 13, 220
Pélargonate	9	6, 8, 10, 11, 12, 220
Caprate	13	13, 220
Subérate	2	Toutes excepté 7 et 12
Sébacate	14	Toutes excepté 220
Citrate	8	6, 7, 8, 10, 12, 13, 14
DL-isocitrate	14	12
D-malate	13	14, 220
Azélaïdate	13	4 220
$\alpha$ -cétoglutarate	14	14
cis-aconitate	9	5, 6, 7, 8, 12, 13
Citraconate	1	Toutes excepté 4
Crotonate	14	220
Benzoate	11	1, 2, 14, 220
<i>para</i> -hydroxybenzoate	1	Toutes excepté 14
Testostérone	1	Toutes excepté 8
Glycine	7	1, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 220
$\beta$ -alanine	1	Toutes excepté 9
DL-valine	4	Toutes excepté 7, 9, 11 et 12
L-leucine	14	220
L-isoleucine	8	3, 4, 5, 6, 10, 13, 220
DL-sérine	2	Toutes excepté 8 et 13
DL-aspartate	4	Toutes excepté 8, 11, 12 et 13
L-glutamate	6	Toutes excepté 1, 2, 3, 5, 14 et 220
L-phénylalanine	1	Toutes excepté 10
L-tyrosine	14	Toutes excepté 220
Acétamide	4	Toutes excepté 1, 9, 11 et 12
Putrescine	5	Toutes excepté 3, 5, 6, 8 et 10

réductase A et la nitrite-réductase respiratoire en anaérobiose et en présence de  $\text{NO}_3^-$ . Seules les souches 4, 8 et 13 croissent à 40°. Seules les souches 4 et 220 ne croissent pas à 40°. L'indole n'est pas produit. La gélatine n'est jamais liquéfiée. Toutes les souches hydrolysent le « Tween 80 ». Seules les souches 7, 9, 11 et 12 ne produisent pas d'amylase

exocellulaire. La nitrate-réductase B a été trouvée seulement chez les souches 1, 2, 4 et 220. L'uréase est produite uniquement par les souches 1, 2, 3 et 4. La réaction au jaune d'œuf est constamment négative. L'arginine-dihydrolase constitutive est synthétisée seulement par les souches 2, 6, 9, 11 et 12. Seules les souches 7, 11, 12 et 220 sont dépourvues de L-phénylalanine-désaminase. Les 15 souches donnent une réaction franchement positive au test à l'oxydase et synthétisent la catalase et un cytochrome de type *c*.

Les souches 3, 4, 6, 8 et 10 réalisent un clivage *ortho* du catéchol au cours de la dégradation du benzoate. Les souches 7, 9, 11 et 12 réalisent un clivage *méta* du catéchol au cours de la dégradation du benzoate ; le niveau de la métapyrocatechase est élevé. Cette enzyme présente un caractère inductible chez les souches 7 et 11 puisqu'elle n'est pas formée dans les cultures contenant seulement de l'extrait de levure. On trouve la pyrocatechase et des traces de métapyrocatechase chez les souches 5 et 13. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence les clivages *ortho* et *méta* du protocatéchuate dans les extraits de la souche 14 cultivée en présence de *para*-hydroxybenzoate. Les souches 7, 9, 11 et 12 produisent une substance brune diffusant dans la gélose lorsqu'elles croissent sur un milieu minimal solide contenant du benzoate comme source de carbone. Lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose dans un milieu contenant 4 g/l d'extrait de levure et 2 g/l de benzoate de sodium, une coloration jaune apparaît. Les spectres des surnageants ont été faits après élimination des cellules par centrifugation. On observe un pic d'absorption à 385 nm qui disparaît après l'addition de HCl. Ce phénomène est vraisemblablement dû à l'accumulation de la semialdéhyde de l'acide  $\alpha$ -hydroxy-muconique, produit de la réaction catalysée par la catéchol-2,3-oxygénase [1].

#### IV. — Dénitrification

La dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote a été étudiée quantitativement avec des suspensions cellulaires non proliférantes des souches 3 et 11. Les activités spécifiques figurent dans les tableaux II et III. Les cellules issues de cultures anaérobies contenant  $\text{NO}_3^-$ , réduisent  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et NO en  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$  ; elles réduisent lentement  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . Les cellules issues de cultures anaérobies sous  $\text{N}_2\text{O}$  réduisent aussi  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et NO en  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$  ; mais elles réduisent rapidement  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . Il semble donc que l'oxyde nitreux-réductase soit induite à un taux maximal seulement lorsque la croissance a lieu en présence de  $\text{N}_2\text{O}$ .

#### V. — Génotype

Les teneurs en guanine + cytosine de l'ADN, exprimées en pour-cent des bases totales, ont les valeurs suivantes : souche 1 = 66, 2 = 65, 3 = 65, 4 = 63, 5 = 65, 6 = 65, 7 = 66, 8 = 65, 9 = 67, 10 = 66,3, 11 = 67,

12 = 66,3 ; 13 = 65, 14 = 66,3, souche 220 = 63,3. La moyenne des 15 valeurs précédentes est de  $65,4 \pm 1,2$ , c'est-à-dire qu'elle correspond au sous-groupe B de *P. stutzeri* [5].

TABLEAU II. — Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche 3.

	Accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l}$ de gaz/mg N/h			Réduction $\mu\text{l}$ de gaz/mg N/h	
		NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>	NO	N <sub>2</sub> O
Culture anaérobie contenant NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	19	13	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	3,5	0,5	—	—
	NO	—	13	7	31	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	4	—	2
Culture anaérobie sous N <sub>2</sub> O	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	27	111	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	14	66	—	—
	NO	—	10,5	17	57	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	443,5	—	422

TABLEAU III. — Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche 11.

	Accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l}$ de gaz/mg N/h			Réduction $\mu\text{l}$ de gaz/mg N/h	
		NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>	NO	N <sub>2</sub> O
Culture anaérobie contenant NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	37,5	24,5	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	37,5	8,5	—	—
	NO	—	29	20	83	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	33	—	29
Culture anaérobie sous N <sub>2</sub> O	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	7	90	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	6	77	—	—
	NO	—	19	faible	32,5	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	1 107	—	1 122

## DISCUSSION

Quatre souches présentent six caractères qui les rendent aisément reconnaissables et les différencient nettement des autres : une morphologie de colonie particulière, l'aptitude à utiliser l'isovalérate et la DL-valine, l'inaptitude à utiliser le glucose, l'absence d'amylase exocellulaire et la présence de la métapyrocatechase à un niveau élevé. Leur G + C % est compris entre 66 et 67. L'existence d'un clivage *méta* du catéchol chez des bactéries appartenant au groupe *P. stutzeri* n'avait jamais été signalée jusqu'ici. C'est pourquoi nous avons recherché le mode de clivage de ce diphenol chez les souches isolées du sol par Palleroni et coll. [8]. Les 9 souches suivantes de *P. stutzeri*, qui assimilent le benzoate, synthétisent la pyrocatechase et ne possèdent pas la métapyrocatechase : CH19, CH29, CH44, CH52, CH53, CH62, CH63, CH69 et CH70. Par contre nous n'avons trouvé aucune de ces deux enzymes chez les souches CH60 et CH80 qui dégradent aussi le benzoate. Il a été vérifié que les souches CH20, CH35, CH50 et CH67 de *P. mendocina*, qui utilisent le benzoate, possèdent la pyrocatechase et ne synthétisent pas la métapyrocatechase.

L'une des souches se distingue des autres par la pigmentation en jaune de ses colonies, par son aptitude à utiliser le D-glucuronate, le tréhalose, le D-sorbitol et le citraconate, par le fait qu'elle croît à 4° mais non à 40°, ainsi que par un G + C % plus faible.

L'une des souches accumule du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Ce caractère est inhabituel chez *P. stutzeri*.

Quatre souches possédant une amylase exocellulaire sont incapables de croître dans un milieu contenant de l'amidon comme seule source de carbone. Les trois stéréoisomères du tartrate ne sont utilisés par aucune des souches, bien que deux d'entre elles aient été isolées en présence de ce composé.

Le présent travail confirme les conclusions auxquelles ont abouti les bactériologistes qui ont étudié récemment *P. stutzeri* [2, 8, 13]. Il est pratiquement impossible de définir un phénotype idéal pour ce groupe qui, en réalité, rassemble des bactéries présentant des caractères extrêmement variables.

Les souches suivantes ont été déposées à la Collection de l'Institut Pasteur : 1, n° CIP 15-75 ; 2, n° CIP 13-75 ; 3, n° CIP 14-75 ; 4, n° CIP 16-75 ; 5, n° CIP 77-75 ; 6, n° CIP 85-75 ; 7, n° CIP 83-75 ; 8, n° CIP 78-75 ; 9, n° CIP 80-75 ; 10, n° CIP 82-75 ; II, n° CIP 109-75 ; 12, n° CIP 107-75 ; 13, n° CIP 108-75 ; 14, n° CIP R893.

## RÉSUMÉ

En aérobiose, les 14 souches utilisent les 25 composés suivants comme sources de carbone et d'énergie : glycérate, éthanol, propanol, acétate,

butyrate, malonate, succinate, glutarate, sébacate, glycolate, L-lactate, D-lactate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, pyruvate, fumarate, itaconate, mésoaconate, crotonate,  $\alpha$ -L-alanine,  $\alpha$ -D-alanine, L-leucine, asparagine, L-tyrosine et L-proline. Elles hydrolysent le Tween 80 mais non la gélatine. Le nitrate est utilisé comme source d'azote. La nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes.

Quatre souches présentent six caractères qui les rendent aisément reconnaissables et les différencient nettement des autres : une morphologie de colonie particulière, l'aptitude à utiliser l'isovalérate et la DL-valine, l'inaptitude à utiliser le glucose, l'absence d'amylase exocellulaire et la présence de la métapyrocatechase à un niveau élevé. Leur G + C % est compris entre 66 et 67.

L'une des souches se distingue des autres par la pigmentation en jaune de ses colonies, par son aptitude à utiliser le D-glucuronate, le tréhalose, le D-sorbitol et le citraconate, par le fait qu'elle croît à 4 mais non à 40° C, ainsi que par un G + C % plus faible (63).

Une souche accumule du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate.

Ce travail confirme la variabilité remarquable bien connue des bactéries appartenant au groupe *P. stutzeri*.

**MOTS-CLÉS:** *Pseudomonas stutzeri*, Sol, Nutrition bactérienne ; Dénitrication, Taxonomie.

#### REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos vifs remerciements au Dr R. E. Solanes (Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentine) qui a mis à notre disposition ses souches de *P. stutzeri* et *P. mendocina*, ainsi qu'à Mlle A. Kurkdjian (Laboratoire de Physiologie Végétale et Physiologie Végétale Appliquée, Université de Paris VI) qui a réalisé les photographies présentées dans cet article.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DAGLEY, S., EVANS, W. C. & RIBBONS, D. W., New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature* (Lond.), 1960, 188, 560-566.
- [2] DOUDOROFF, M. & PALLERONI, N. J., Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237 Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 121, in « Bergey's manual of determinative bacteriology », 8<sup>e</sup> édition (R. E. Buchanan & N. E. Gibbons) (p. 217-243), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [3] GARCIA, J.-L., Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 79-84.
- [4] HAYAISHI, O., Crystalline oxygenases of pseudomonads. *Bact. Rev.*, 1966, 30, 720-731.
- [5] MANDEL, M., Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas*. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 273-292.

- [6] MANDEL, M., SCHILDKRAUT, C. L. & MARMUR, J., Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA, in « Methods in enzymology » (S. P. Colowick & N. O. Kaplan), 12 B (p. 184-195), Academic Press, New York, 1968.
- [7] MIYATA, M. & MORI, T., Studies on denitrification. — VIII. Production of nitric oxide by denitrifying reaction in the presence of tetramethyl-*p*-phenylenediamine. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1968, 64, 849-861.
- [8] PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M., STANIER, R. Y., SOLÁNES, R. E. & MANDEL, M., Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. gen. Microbiol.*, 1970, 60, 215-231.
- [9] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [10] RIBBONS, D. W. & EVANS, W. C., Oxidative metabolism of protocatechuic acid by certain soil pseudomonads: a new ring-fission mechanism. *Biochem. J.*, 1962, 83, 482-492.
- [11] SCHILDKRAUT, C. L., MARMUR, J. & DOTY, P., Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J. mol. Biol.*, 1962, 4, 430-433.
- [12] STANIER, R. Y. & INGRAHAM, J. L., Protocatechuic acid oxidase. *J. biol. Chem.*, 1954, 210, 799-808.
- [13] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271.
- [14] VAN ITERSOM, G. JR, Accumulation experiments with denitrifying bacteria. *Proc. kon. ned. Akad. Wet.*, 1902, 5, 148-162.
- [15] VAN NIEL, C. B. & ALLEN, M. B., A note on *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bact.*, 1952, 64, 413-422.