

ÉTUDE DE SIX SOUCHES  
DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*  
ET *A. RADIOBACTER*

par F. Pichinoty, M. Mandel 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

A STUDY OF SIX CULTURES OF « *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* »  
AND « *A. RADIOBACTER* »

Over 200 characters have been compared within six cultures of *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* and *A. radiobacter*) capable of producing 3-ketoglycosides. Two of these cultures were isolated from soil by enrichment cultures in minimal media containing a Krebs cycle organic acid as sole carbon and energy source. Incubation was at 32° C in an atmosphere of N<sub>2</sub>O.

The six cultures are chemo-organotrophs and none require any growth factor. Their metabolism is oxidative. In the absence of O<sub>2</sub>, two cultures can utilize nitrate, nitrite and nitrous oxide as electron acceptors with production of dinitrogen. Poly-β-hydroxybutyrate is not synthesized by any of these bacteria.

The following 53 compounds are utilized as carbon and energy sources by all six cultures: D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, fructose, D-glucosamine, α-methyl-D-glucoside, β-methyl-D-glucoside, α-methyl-D-galactoside, D-saccharate, D-xylose, D-arabinose, L-arabinose, L-rhamnose, D-ribose, β-methyl-D-xyloside, lactose, maltose, sucrose, cellobiose, trehalose, arbutin, D-melezitose, raffinose, 2-keto-D-gluconate, D-mannitol, D-sorbitol, D-dulcitol, ribitol, D-arabitol, L-arabitol, glycerol, glycerate, ethanol, propanol, acetate, succinate, D-lactate, L-malate, D-malate, pyruvate, fumarate, *cis*-aconitate, quinate, α-L-alanine, asparagine, glutamine, L-arginine, DL-ornithine, L-histidine, L-proline, ethanalamine and 4-amino-*n*-butyrate.

Manuscrit reçu le 25 janvier 1977, accepté le 8 mars 1977.

26 AOUT 1977

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

Collection de Références

n° M 8645 Bio Sol

CR

The organisms are oxidase and catalase positive and contain a cytochrome *c*. Neither gelatin nor starch nor « Tween 80 » are hydrolyzed. Keto-lactose is produced from lactose. Respiratory nitrite reductase and  $\beta$ -galactosidase are present. Nitrate reductase B is synthesized by the four denitrifying cultures. Constitutive arginine dihydrolase and nitrate reductase A are absent. Quinate is degraded via *ortho* cleavage of protocatechuate. The six cultures assimilate  $\text{NO}_3^-$ .

Suspensions of induced cells of one strain are capable of reducing  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and NO to  $\text{N}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$ . These suspensions can also reduce  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$ .

The base compositions of the DNA isolated from the six cultures range from 58 to 59.2 mole percent guanine plus cytosine.

The six cultures have 81 % similarity of the nutritional characters studied. The majority of the compounds used as carbon and energy sources are carbohydrates; relatively few organic or amino acids are utilized.

Our work confirms the conclusions of others:

— *A. radiobacter* cannot be distinguished biochemically from *A. tumefaciens*;

— the latter species can be considered as a pathogenic variety of the former.

KEY-WORDS: *Agrobacterium*, Nutrition, Denitrification; Taxonomy, Biochemical characters.

## INTRODUCTION

Nous présentons dans cet article les résultats acquis au cours de l'étude de six souches de *Agrobacterium tumefaciens* et *A. radiobacter* capables de produire des 3-cétoglycosides. Le principal intérêt de ce travail réside dans le nombre élevé de caractères nutritionnels, biochimiques ou physiologiques examinés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1) Souches étudiées

Les souches B6m, A6 et IIBV7 de *A. tumefaciens* proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur et nous ont été transmises par le Dr P. Manigault. Leur origine est indiquée ci-après :

1) Souche B6m : n° CIP 67-I, A.C. Braun, souche isolée du « crown-gall » d'un plant de pommier à Shenandoah, Iowa (USA) en 1934 [8].

2) Souche A6 : Edinburgh, A. M. Paton *via* D. W. Dye, souche isolée de la galle d'un peuplier [7] ;

3) Souche IIBV7 : G. Heberlein, dérivée de la souche IIB de Stapp, isolée elle-même à partir de *Chrysanthemum frutescens* en Allemagne, en 1927 [8].

4) Souche R 1005 de *A. radiobacter* : elle provient du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) ; son origine n'est pas connue.

5) Souches 1 et 2 : nous les avons isolées à partir de terre de jardin par culture d'enrichissement dans un milieu minimal liquide contenant 4 g/l de l'aliment carboné, en ballons remplis de  $N_2O$ .

Ce milieu, qui est tamponné à pH 7, contient un sel d'ammonium mais ne contient pas de nitrate [11]. L'aliment carboné est du L-malate dans le cas de la souche 1, du succinate dans le cas de la souche 2.

La température d'incubation est de 32° C. Après plusieurs passages, l'isolement est effectué sur le même milieu solidifié par l'addition d'agar. Les boîtes sont placées en incubation aérobie, à 32°, pendant 24 à 48 h. Après plusieurs étalements successifs, on vérifie la pureté des cultures.

Les souches 1 et 2 ont été déposées à la Collection de l'Institut Pasteur où elles portent respectivement les numéros CIP 74-75 et 105-75. Le Dr K. Kersters (Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Gent, Belgique) a observé que ces deux souches ne formaient pas de tumeurs sur des plants de tomate ou des disques de carotte.

## 2) Méthodes utilisées.

La plupart des tests employés au cours de l'étude des caractères biochimiques et physiologiques ont été décrits par Stanier et coll. [13]. La production des 3-cétoglycosides a été recherchée par le procédé de Bernaerts et De Ley [2]. Les autres techniques ont déjà été mentionnées [10, 11].

## RÉSULTATS

### 1) Morphologie

Les organismes se présentent sous la forme de petits bâtonnets, à Gram négatif, dépourvus de capsule, non sporulés, se multipliant par scissiparité. Les souches A6 et IIBV7 ne sont pas mobiles. Par contre les souches B6m, R1005, 1 et 2 sont mobiles par le moyen de flagelles péritriches, peu nombreux. Sur gélose nutritive contenant du saccharose, les colonies sont convexes, circulaires, opaques, blanchâtres et mucoïdes, et peuvent atteindre 9 mm de diamètre.

### 2) Culture et caractères physiologiques

Les six souches sont chimio-organotrophes et n'exigent aucun facteur de croissance. Leur métabolisme est toujours respiratoire. Les souches 1 et 2 utilisent, en anaérobiose, le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux comme accepteurs d'électrons. Les souches B6m et R1005 croissent, en anaérobiose, en présence de  $NO_3^-$  ou de  $NO_2^-$ , mais n'utilisent pas  $N_2O$ . Les souches A6 et IIBV7 ne dénitrifient aucun de ces trois composés et doivent donc être considérées comme aérobies strictes. Le tétrathionate n'est pas utilisé comme accepteur d'électrons. On n'observe aucune croissance à + 4° et à + 40°. Les six souches croissent en bouillon nutritif à pH 9 et en bouillon nutritif normal contenant 3 % de NaCl. Seules les souches B6m, A6, IIBV7 et R1005 tolèrent 6 % de NaCl. Les organismes ne syn-

thétisent pas de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate lorsqu'ils croissent en milieu minimal carencé en azote contenant du DL-3-hydroxybutyrate ou un autre aliment carboné.

Les 53 composés suivants sont utilisés, en aérobiose, comme sources de carbone et d'énergie par les six souches : D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, fructose, D-glucosamine,  $\alpha$ -méthyl-D-glucoside,  $\beta$ -méthyl-D-glucoside,  $\alpha$ -méthyl-D-galactoside, D-saccharate, D-xylose, D-arabinose, L-arabinose, L-rhamnose, D-ribose,  $\beta$ -méthyl-D-xyloside, lactose, maltose, saccharose, cellobiose, tréhalose, arbutine, D-mélézitose, raffinose, 2-céto-D-gluconate, D-mannitol, D-sorbitol, D-dulcitol, ribitol, D-arabitol, L-arabitol, glycérol, glycérate, éthanol, propanol, acétate, succinate, D-lactate, L-malate, D-malate, pyruvate, fumarate, *cis*-aconitate, quinate,  $\alpha$ -L-alanine, asparagine, glutamine, L-arginine, DL-ornithine, L-histidine, L-proline, éthanolamine et 4-amino-*n*-butyrate.

Les 80 composés suivants ne sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie par aucune des six souches : L-glucose,  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside, amidon, *méso*-érythritol, 1,2-propanediol, 1,2-éthanediol, butanol, isobutanol, méthanol, 2-phényl-éthanol, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate, isovalérate, caproate, caprate, oxalate, malonate, adipate, pimélate, subérate, sébacate, glycolate, tartronate,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -méthylglutarate, *d*-tartrate, *méso*-tartrate, mucate, azélaïdate, lévulinate, maléate, itaconate, mésoaconate, citraconate, crotonate, benzoate, *o*-hydroxybenzoate, *p*-hydroxybenzoate, *m*-hydroxybenzoate, phtalate, L-mandélate, D-mandélate, téréphtalate, nicotinate, cinnamate, hippurate, anthranilate, *p*-aminobenzoate, phénylacétate, benzoylformate, kynurénate, naphthalène, testostérone, dodécane, hexadécane, glycine, créatine,  $\alpha$ -D-alanine, DL-valine, DL-norvaline, L-norleucine, L-isoleucine, DL-thréonine, DL-méthionine, L-lysine, histamine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, D-tryptophane, tryptamine, méthylamine, *n*-butylamine, *n*-amylamine, benzylamine, DL-2-amino-*n*-butyrate, putrescine, spermine et géranol.

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

Les organismes sont oxydase-positifs, possèdent la catalase et un cytochrome de type *c*. La gélatine, l'amidon et le « Tween-80 » ne sont pas hydrolysés. Les six souches produisent du céto-lactose à partir du lactose. Seules les souches A6 et IIBV7 produisent du céto-sucrose à partir du sucrose. Seules enfin les souches B6m, A6, IIBV7 et 1 produisent du céto-maltose à partir du maltose. La  $\beta$ -galactosidase est toujours présente lorsque les bactéries ont crû en présence de lactose. La nitrite-réductase respiratoire, qui catalyse la réduction de  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}$  en présence de tétraméthyl-*p*-phénylènediamine, a été mise en évidence dans les extraits enzymatiques des quatre souches dénitrifiantes. Celles-ci possèdent uniquement la nitrate-réductase de type B [12]. L'uréase est présente chez les souches A6, IIBV7, 1 et 2, et absente chez les souches B6m et R1005. L'arginine-dihydrolase constitutive est partout absente. La L-phénylalanine-désaminase est présente seulement chez la souche 1. Les six souches assimilent  $\text{NO}_3^-$ .

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

Substrat	Nombre de souches négatives	Souches positives
L-sorbose	5	B6m
D-fucose	1	B6m, A6, R1005, 1, 2
$\beta$ -méthyl-D-galactoside	4	1, 2
Salicine	3	B6m, 1, 2
D-gluconate	3	A6, 1, 2
D-glucuronate	4	1, 2
$\alpha$ -méthyl-D-xyloside	2	B6m, R1005, 1, 2
Inosine	1	B6m, A6, IIBV7, R1005, 1
D-érythrose	5	1
Mélibiose	1	B6m, IIBV7, R1005, 1, 2
Inuline	5	A6
2,3-butanediol	4	R1005, 2
Pélagronate	5	2
Glutarate	5	B6m
Citrate	4	1, 2
DL-isocitrate	4	1, 2
L-lactate	1	B6m, A6, R1005, 1, 2
DL-3-hydroxybutyrate	1	B6m, IIBV7, R1005, 1, 2
<i>l</i> -tartrate	5	IIBV7
$\alpha$ -cétoglutarate	1	B6m, IIBV7, R1005, 1, 2
<i>trans</i> -aconitate	1	B6m, A6, IIBV7, R1005, 1
<i>d</i> -pantothénate	4	R1005, 1
Sarcosine	1	B6m, A6, IIBV7, R1005, 2
Bétaïne	2	B6m, A6, R1005, 1
$\beta$ -alanine	2	B6m, IIBV7, R1005, 2
L-leucine	5	1
DL-sérine	5	2
DL-aspartate	5	2
L-glutamate	1	B6m, A6, IIBV7, R1005, 1
L-citrulline	3	A6, 1, 2
Acétamide	5	1

Cela peut paraître surprenant dans le cas des souches A6 et IIBV7 chez lesquelles les nitrate-réductases A et B n'ont jamais été mises en évidence. Les six souches réalisent un clivage *ortho* du protocatéchuete au cours de la dégradation du quinate [13].

Les suspensions cellulaires de la souche 1 issues de cultures anaérobies contenant  $\text{NO}_3^-$ , réduisent  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}$  en  $\text{N}_2$  et  $\text{N}_2\text{O}$ . Elles réduisent aussi  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ .

### 3) Génotype

Les teneurs en guanine + cytosine de l'ADN, calculées à partir de la densité de flottaison, ont les valeurs suivantes : B6m, 58,7 % ; A6, 58,7 % ; IIBV7, 58,2 % ; R1005, 59,2 % ; 1, 59 % ; 2, 58 %. La moyenne de ces valeurs est de  $58,6 \pm 0,5$ .

## DISCUSSION

Les six souches ont en commun 81 % des caractères nutritionnels étudiés. Elles utilisent comme sources de carbone et d'énergie la plupart

des hydrates de carbone, mais relativement peu d'acides organiques ou d'acides aminés. Leur G + C % se situe dans une zone étroite délimitée par les valeurs 58 et 59,2. Plusieurs de ces souches ont un pouvoir dénitrifiant élevé, comparable à celui de diverses espèces de *Pseudomonas* ou de *Alcaligenes* [10, 13]. Les observations antérieures de Kersters et coll. [8] faisaient déjà état d'une réduction du nitrite et d'une croissance en milieu complexe contenant  $\text{NO}_3^-$ , en anaérobiose. Il s'ensuit que les agrobactéries, qui sont des habitants normaux du sol [1], doivent jouer un rôle dans le cycle de l'azote.

Dans le passé, la différenciation des membres des genres *Agrobacterium* et *Alcaligenes* présentait quelques difficultés [1]. En effet, ces bactéries morphologiquement semblables présentent une ciliation péritriche et ont en commun les caractères suivants : une réaction à l'oxydase positive, un métabolisme respiratoire obligatoire (respiration d' $\text{O}_2$  et dénitrification), l'absence de la L-phénylalanine-désaminase, de l'arginine-dihydrolase constitutive et des hydrolases exocellulaires (protéases, amylase et lipase) et la capacité d'assimiler le nitrate. Le test sensible, rapide et spécifique de Bernaerts et De Ley [2] avait déjà apporté une solution à ce problème. Sur le plan nutritionnel, les deux types de microorganismes présentent des différences considérables puisque la souche dénitrifiante de *Alcaligenes* précédemment décrite utilise de nombreux alcools, acides organiques et acides aminés mais n'utilise aucun hydrate de carbone. Enfin elle produit du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate et présente un G + C % de 66 [10].

Notre travail conduit aux mêmes conclusions que celles des autres auteurs : *A. radiobacter* ne peut pas être distingué biochimiquement de *A. tumefaciens* [1, 4, 5, 8, 9, 14, 15]. Les résultats des expériences d'hybridation d'ADN [6] et les études sérologiques et électrophorétiques apportent des arguments dans le même sens [7]. C'est pourquoi De Ley et coll. [4] considèrent *A. tumefaciens* (*A. radiobacter* var. *tumefaciens*) comme une variété pathogène de *A. radiobacter*.

Il est intéressant de noter que les 28 composés suivants, qui sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie par une ou plusieurs des souches étudiées, se trouvent dans la sève de diverses plantes : glucose, fructose, galactose, maltose, mannose, mélibiose, raffinose, sucrose, tréhalose, dulcitol, mannitol, sorbitol, citrate,  $\alpha$ -cétoglutarate, malate, succinate, tartrate, alanine,  $\gamma$ -aminobutyrate, arginine, asparagine, aspartate, citrulline, glutamate, glutamine, leucine, sérine et pantothénate [3].

## RÉSUMÉ

Six souches de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* et *A. radiobacter*) capables de produire des 3-cétoglycosides ont été étudiées sur la base de plus de 200 caractères.

Les six souches sont chimio-organotrophes et n'exigent aucun facteur de croissance. Leur métabolisme est respiratoire. Deux d'entre elles utilisent,

en anaérobiose, le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux comme accepteurs d'électrons. Ces composés sont alors réduits en N<sub>2</sub>. Les bactéries ne synthétisent pas de poly-β-hydroxybutyrate.

Les six souches utilisent comme source de carbone et d'énergie la plupart des hydrates de carbone, mais peu d'acides organiques et d'acides aminés.

Ces microorganismes sont oxydase-positifs, possèdent la catalase et un cytochrome de type c. La gélatine, l'amidon et le « Tween 80 » ne sont pas hydrolysés. Les six souches produisent du céto-lactose à partir du lactose. La β-galactosidase et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. La nitrate-réductase B est synthétisée par les quatre souches dénitrifiantes. L'arginine-dihydrolase constitutive et la nitrate-réductase A sont absentes. La dégradation du quinate procède d'un clivage *ortho* du protocatéchuate. Les six souches assimilent NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Les teneurs en guanine + cytosine de l'ADN sont comprises entre 58 et 59,2 %.

*A. radiobacter* ne peut pas être distingué biochimiquement de *A. tumefaciens* ; la seconde espèce peut être considérée comme une variété pathogène de la première.

MOTS-CLÉS : *Agrobacterium*, Nutrition, Dénitrification ; Taxonomie, Caractères biochimiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLEN, O. N. & HOLDING, A. J., *Genus II. Agrobacterium Conn* 1942, 359. *Nom. gen. cons. Opin.* 33, *Jud. Comm.* 1970, 10, in « *Bergey's manual of determinative bacteriology* » (8<sup>e</sup> édit.), (R. E. Buchanan & N. E. Gibbons), (p. 264-267), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [2] BERNAERTS, M. J. & DE LEY, J., A biochemical test for crown-gall bacteria. *Nature (Lond.)*, 1963, 197, 406-407.
- [3] CRAFTS, A. S. & CRISP, C. E., Phloem transport in plants (D. Kennedy & R. B. Park), (p. 85-150), Freeman W. H. & Co., San Francisco, 1971.
- [4] DE LEY, J., BERNAERTS, M., RASSEL, A. & GUILMOT, J., Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 7-17.
- [5] GRAHAM, P. H., The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. gen. Microbiol.*, 1964, 35, 511-517.
- [6] HEBERLEIN, G. T., DE LEY, J. & TIJTGAT, R., Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium*, and *Chromobacterium*. *J. Bact.*, 1967, 94, 116-124.
- [7] KEANE, P. J., KERR, A. & NEW, P. B., Crown-gall of stone-fruit. — II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. biol. Sci.*, 1970, 23, 585-595.
- [8] KERSTERS, K., DE LEY, J., SNEATH, P. H. A. & SACKIN, M., Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. gen. Microbiol.*, 1973, 78, 227-239.
- [9] MOFFETT, M. L. & COLWELL, R. R., Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. *J. gen. Microbiol.*, 1968, 51, 245-266.
- [10] PICHINOTY, F., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J.-L., Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre *Alcaligenes*. *C. R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1975, 281, 1273-1275.

- [11] PICHINOTY, F., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J.-L., Étude 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)*, 1977, 128 A, 75-87.
- [12] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [13] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271.
- [14] 'T MANNETJE, L., A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1967, 33, 477-491.
- [15] WHITE, L. O., The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *J. gen. Microbiol.*, 1972, 72, 565-574.
-