

UNE NOUVELLE BACTÉRIE SPORULÉE,
DÉNITRIFIANTE, MÉSOPHILE :
BACILLUS AZOTOFORMANS N. SP.

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

Laboratoire de Biochimie Végétale, UER Scientifique de Luminy, Marseille, Service
de Lutte Bactériologique contre les Insectes, Institut Pasteur, Paris, The University
of Texas, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas et
Laboratoire de Microbiologie, O. R. S. T. O. M., Dakar (Sénégal)

SUMMARY

A NEW, SPORULATING, DENITRIFYING, MESOPHILIC BACTERIUM:
« *BACILLUS AZOTOFORMANS* » N. SP.

The described bacterium was isolated by enrichment culture in peptone broth inoculated with garden soil, pasteurized and then put to incubate under N_2O at 32° . It is a Gram-negative rod, motile with peritrichous flagella, and producing oval spores without exosporium in swollen sporangia. However, cells have the thick walls, mesosomes and persistent septa characteristic of Gram-positive bacteria. It lacks fermentative activity, does not attack carbohydrates, has complex growth requirements, and will grow anaerobically only if one of the following electron acceptors is present: NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $S_4O_6^{--}$, and fumarate. Nitrate, nitrite, and nitrous oxide are denitrified with production of N_2 . The microorganism is mesophilic, gives a positive oxidase reaction, synthesizes a type c cytochrome, and does not hydrolyse gelatin, starch nor « Tween 80 ». The following enzymes are present: nitrate reductase A, respiratory nitrite reductase, tetrathionate and fumarate reductases, L-glutamate dehydrogenase, and superoxide dismutase. The following enzymes are absent: thiosulfate reductase, urease, lecithinase, arginine dihydrolase, L-alanine dehydrogenase, phenylalanine desaminase, and catalase. The GC % of its DNA is 39. The bacterium described can be considered to be a new species. We propose the name *Bacillus azotoformans* n. sp.

KEY-WORDS: *Bacillus*, *Bacillus azotoformans* n. sp., Denitrification, Soil.

Manuscrit reçu le 30 juin 1976, accepté le 15 septembre 1976.

26 AOUT 1977

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

Collection de Référence

8646 Bio Sols
M

CR

INTRODUCTION

L'objectif initial du présent travail était de déterminer s'il existe des bactéries sporulées qui soient capables d'utiliser l'oxyde nitreux comme substrat respiratoire. On sait en effet que ce gaz, qui constitue l'avant-dernière étape dans la réduction de NO_3^- en N_2O , est utilisé comme accepteur d'électrons par la plupart des espèces dénitrifiantes non sporulées [13].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Isolement.*

Les cultures d'enrichissement ont été faites dans le milieu de base suivant : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3,575 g ; KH_2PO_4 , 0,98 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g ; NH_4Cl , 0,5 g ; « bacto-peptone », 10 g ; solution d'oligo-éléments, 0,2 ml ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 7. Ce milieu est réparti en ballons de 250 ml à raison de 50 ml par ballon. Après ensemencement avec de la terre de jardin, ces derniers sont pasteurisés à 80° C pendant 10 min, puis remplis de N_2O et placés en incubation à 32°. La croissance, rapide et dense, est toujours accompagnée d'une mousse abondante due à la production d'un fort dégagement gazeux. Après plusieurs passages, on procède à des isolements sur gélose nutritive. Les boîtes sont placées en incubation aérobie à 32° pendant 48 h ; quelques colonies sont repiquées. On s'assure que les bactéries isolées croissent et dénitrifient en milieu peptoné liquide sous atmosphère de N_2O . Après plusieurs étalements successifs, la pureté des cultures est vérifiée. Les souches 1 et 2 ont ainsi été isolées à partir de deux échantillons de terre.

2) *Méthodes et critères utilisés.*

Les flagelles ont été mis en évidence au microscope optique après coloration par la technique de Rhodes [17] et au microscope électronique après coloration négative. Les cultures destinées à l'obtention de suspensions cellulaires denses et à la préparation des extraits enzymatiques ont été faites, à 32°, dans un milieu contenant les sels minéraux habituels et 4 g par litre d'extrait de levure. Les extraits enzymatiques ont été préparés par traitement sonique ou par décompression avec la cellule de French. La nitrate-réductase A (cultures anaérobies contenant NO_3^-), les tétrathionate-, thiosulfate- (cultures anaérobies contenant $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) et fumarate-réductases (cultures anaérobies contenant du fumarate) ont été recherchées dans les extraits par une technique manométrique [14]. La nitrite-réductase respiratoire (cultures anaérobies contenant NO_3^-) a été mise en évidence dans les extraits par la production de NO en présence de N,N,N',N' -tétraméthyl-*p*-phénylène-diamine [12]. L'activité catalasique des cellules (cultures aérobies) et des extraits a été estimée par dosage iodométrique de H_2O_2 [6]. La superoxyde-dismutase (cultures aérobies) a été recherchée dans les extraits [3]. L'arginine-dihydrolase a été recherchée sur des suspensions cellulaires (cultures aérobies) par le procédé de Stanier et coll. [18]. Les L-alanine- et L-glutamate-déshydrogénases (cultures aérobies) ont été identifiées par spectrophotométrie en présence de NAD et NADP respectivement [7]. Les gaz formés au cours de la réduction de NO_3^- , NO_2^- , NO et N_2O en présence d'extrait de levure par les suspensions cellulaires, ont été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse [4]. Le poly- β -hydroxybutyrate a été recherché cytologiquement par coloration au noir Soudan et chimiquement après extraction par le chloroforme bouillant et conversion en acide

crotonique sous l'action de H_2SO_4 [9]. La teneur en guanine + cytosine de l'ADN a été calculée à partir de la densité de flottaison [11, 15]. Les méthodes de diagnostic courantes sont décrites dans les ouvrages spécialisés [5, 17]. Toutes les cultures ont été faites à 30 ou 32°.

RÉSULTATS

I. — Morphologie

L'organisme se présente sous la forme de bâtonnets mobiles, aux extrémités arrondies, ayant 3 à 7 μm de long et 0,5 à 0,8 μm de large, rarement en chaînettes, présentant une ciliation péritriche et dépourvus de capsule. Le Gram est négatif même sur des cellules jeunes en phase de croissance. Cependant, l'examen au microscope électronique des coupes de cellules (fig. 1) révèle l'existence d'une paroi homogène et épaisse, ainsi que la présence de mésosomes et d'un septum persistant, tous ces caractères étant typiques des bactéries à Gram positif. Les spores, mesurant 1,5 à 2 μm sur 1 μm , sont elliptiques, terminales ou subterminales, nettement déformantes, ce qui produit des sporanges renflés en forme de fuseaux ou de navettes. Elles sont dépourvues d'exosporium et comportent un cortex et des tuniques apparemment lisses comme c'est le cas de la plupart des *Bacillus* (fig. 2). Ce bacille sporule difficilement, et ses spores n'ont pu être observées qu'au bout de 8 à 10 jours de culture à 30° en milieux liquides à base de « bacto-peptone » (Difco) et de « yeast extract » (Difco) à 3 g ‰. Les colonies sur gélose nutritive sont convexes, circulaires, mi-translucides, moirées ; leur diamètre peut atteindre 5 mm après plusieurs jours d'incubation à 32° lorsque le milieu contient, par litre, 4 g d'extrait de levure.

II. — Culture et caractères physiologiques

La croissance est rapide, dense et uniforme dans un milieu contenant les sels minéraux habituels et 4 g par litre d'extrait de levure. Il n'apparaît pas de voile à la surface. L'organisme présente des exigences complexes en facteurs de croissance. En effet, il ne croît pas, en aérobiose, dans le milieu de base (cf. Matériel et Méthodes) sans peptone et contenant les sels minéraux, 100 mg par litre d'extrait de levure et 4 g par litre de l'un des aliments carbonés suivants : acétate, fumarate, succinate, L-malate, citrate, DL-lactate, propionate, glycérol, éthanol, propanol, butanol, adipate, glucose, galactose, L-arabinose, maltose, lactose, cellobiose, mannitol ou gluconate. Il ne se développe pas non plus, en aérobiose, dans le milieu minéral de base contenant 100 mg par litre d'extrait de levure et 10 g par litre de glucose et de L-glutamate, ou de glycérol et de L-glutamate, ou de glucose et d' α -cétoglutarate, ou de glycérol et d' α -cétoglutarate, ou de glucose et de citrate ou de glycérol et de citrate [16].

Dans les conditions anaérobies et en milieu complexe contenant 4 g par litre d'extrait de levure, l'organisme ne croît qu'en présence de

NO_3^- (KNO_3 , 5 g/l), NO_2^- (KNO_2 , 0,5 g/l), N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$ ($\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$, 2 g/l) ou fumarate (fumarate de sodium, 2,5 g/l), et ne fait fermenter aucun des hydrates de carbone (5 g/l) suivants : glucose, D-galactose, fructose, L-sorbose, D-arabinose, L-rhamnose, D-ribose, D-xylose, lactose, maltose et saccharose. Il possède donc un métabolisme obligatoirement respiratoire. Le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux sont réduits avec production de gaz. La réduction du tétrathionate produit du thiosulfate et entraîne une acidification. Le thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 2 g/l) n'est pas utilisé comme accepteur d'électrons.

L'organisme croît sur gélose nutritive à pH 6 et en milieu au KCN de Braun. Il ne croît pas en bouillon glucosé contenant 0,02 % de NaN_3 , en bouillon contenant 0,001 % de lysozyme et en milieu de Sabouraud glucosé à pH 5,7. Il ne produit pas de pigment sur gélose à la tyrosine, ni sur gélose à la pomme de terre. La tyrosine n'est pas décomposée. Il n'y a pas formation d'indole ni d'acétyl-méthyl-carbinol. On n'observe pas de production d'acide benzoïque dans un milieu contenant de l'hippurate. La croissance sur gélose nutritive contenant du glycérol n'est pas accompagnée d'une formation de dihydroxyacétone. Aucune acidification n'accompagne la croissance sur milieux pour la recherche de l'attaque des sucres et polyols usuels [1]. L'amidon, la gélatine et le « Tween 80 » ne sont pas hydrolysés. La température maximale de croissance se situe au voisinage de 45°.

Lorsqu'il est appliqué à des colonies, le test à l'oxydase donne un résultat faiblement positif. Par contre, la réaction est franchement positive avec les extraits enzymatiques. Un cytochrome de type *c* est synthétisé. Les enzymes suivantes sont présentes : nitrate-réductase A, nitrite-réductase respiratoire, tétrathionate- et fumarate-réductases, L-glutamate-déshydrogénase, superoxyde-dismutase et RNase exocellulaire. Les enzymes suivantes sont absentes : thiosulfate-réductase, catalase, uréase, lécithinase, arginine-dihydrolase, L-alanine-déshydrogénase, phénylalanine-désaminase, tryptophane-désaminase, lysine-décarboxylase, β -galactosidase, DNase exocellulaire et chitinase.

Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies sous N_2O réduisent rapidement ce gaz en N_2 et produisent NO , N_2O et N_2 à partir de NO_2^- . Celles qui proviennent de cultures anaérobies contenant NO_3^- réduisent NO_3^- , NO_2^- et NO avec production de N_2 et N_2O .

III. — Génotype

La teneur en guanine + cytosine de l'ADN est de 39 % chez la souche 1 et de 39,3 % chez la souche 2.

FIG. 1. — Étude au microscope électronique de la souche 1 : aspect d'une coupe de cellule végétative. ($\times 63.000$; la barre représente 1 μm).

(Photo A. Ryter, Institut Pasteur, Paris).

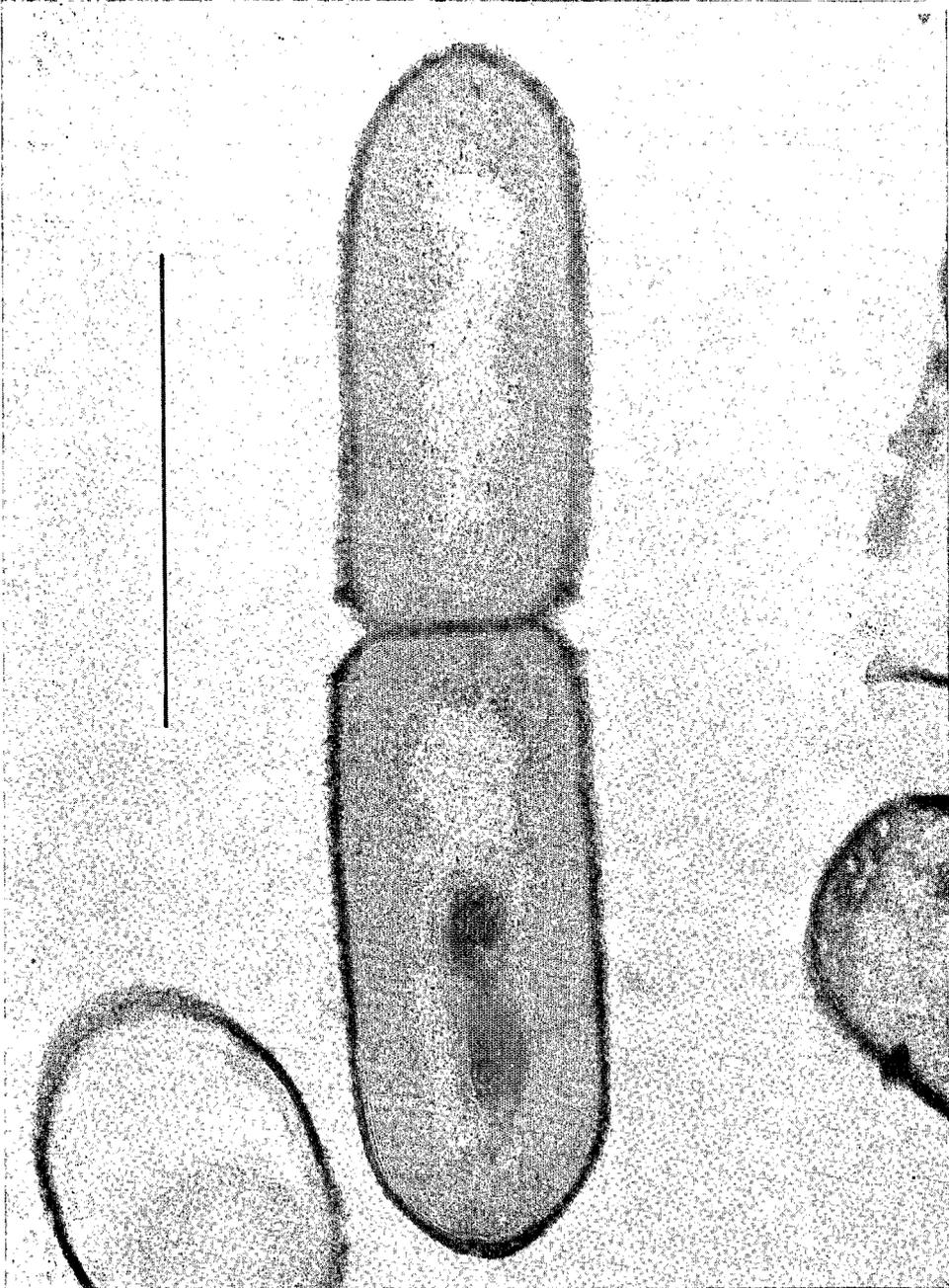


FIG. 1

FIG. 2. — *Étude au microscope électronique de la souche 1 :
aspect d'une coupe de spore incluse dans la cellule-mère.*
($\times 77.000$; la barre représente $1 \mu\text{m}$).

(Photo A. Ryter, Institut Pasteur, Paris).

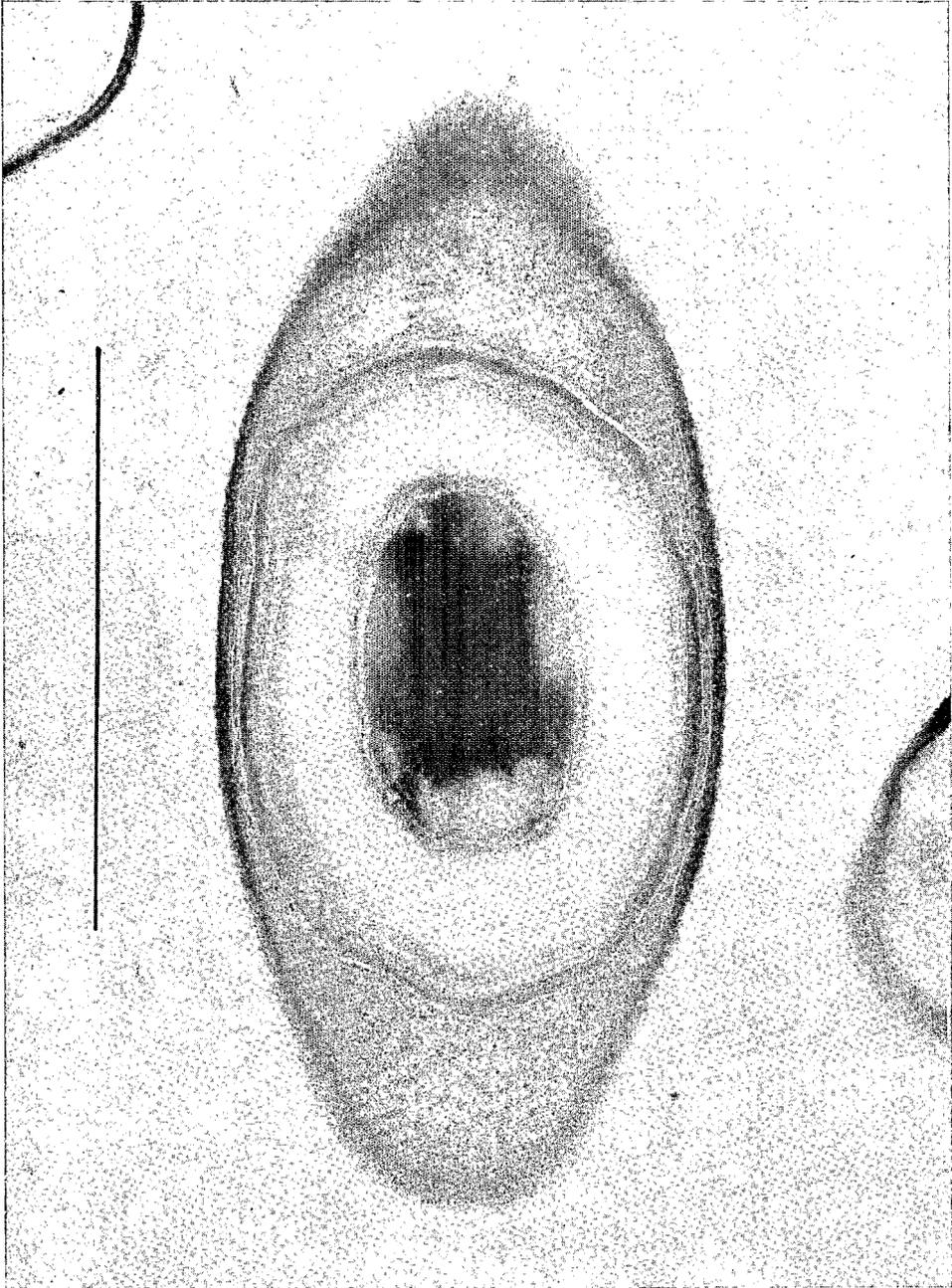


FIG. 2

IV. — *Taxonomie*

Les souches 1 et 2 sont identiques et représentent une espèce appartenant au second groupe morphologique du genre *Bacillus* [1]. Elles ressemblent morphologiquement à *B. brevis* qui est aussi une espèce oxydase-positive dénuée d'activité fermentaire [1]. Cependant nous avons établi que les souches 5122 et 5286 (Collection de l'Institut Pasteur) de *B. brevis* ne croissent pas, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$ ou fumarate, qu'elles liquéfient la gélatine, qu'elles produisent une catalase, une arginine-dihydrolase, une lécithinase (1) et qu'elles ont la L-alanine-déshydrogénase au lieu de la L-glutamate-déshydrogénase. De plus, les valeurs des GC % des souches 5122 et 5286 sont respectivement de 44,9 et 48. Les souches 46B5, 46E9 et 57E4 (Collection de l'Institut Pasteur) de *B. nitritollens*, qui réduisent NO_3^- en NO_2^- , ont été aussi examinées, comparativement. Elles ne croissent pas non plus, dans les conditions anaérobies, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . De surcroît, cette bactérie est oxydase-négative, fait fermenter le glucose, possède une catalase et une amylase [2]. Les valeurs des GC % des souches 46B5 et 46E9 sont respectivement de 37,8 et 41,8. *B. thermodenitrificans* est une bactérie thermophile, à Gram négatif, produisant des spores ovales et déformantes [8]. Nous avons examiné les souches 465 et 466 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen), cultivées à 50°. On n'observe aucune croissance à 37°. Aucune des deux souches ne croît, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O ou $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$. La souche 465 réduit NO_3^- en NO_2^- et ne fait pas fermenter le glucose, contrairement à la souche 466 qui ne réduit pas NO_3^- en NO_2^- et fait fermenter le glucose. Les valeurs des GC % des souches 465 et 466 sont respectivement de 52 et 40,8. Par conséquent, elles ne représentent pas la même espèce. Il semble donc bien que l'on doive considérer la bactérie décrite comme une nouvelle espèce pour laquelle nous proposons le nom de *Bacillus azotoformans* n. sp.

La seule bactérie dénitrifiante, sporulée, mésophile, bien connue, est *B. licheniformis* qui est à Gram positif et qui produit des spores non déformantes [10], ce qui classe cette espèce dans le premier groupe morphologique du genre *Bacillus*.

On remarquera l'absence de catalase chez la bactérie décrite, fait assez rare chez les *Bacillus* et signalé seulement, semble-t-il, chez certains représentants de l'espèce *B. stearothermophilus* et chez les trois espèces *B. larvae*, *B. popilliae* et *B. lentimorbus* qui sont pathogènes pour les insectes [5].

RÉSUMÉ

La bactérie décrite est un bâtonnet à Gram négatif, mobile au moyen de flagelles péritriches et produisant des spores ovales, déformantes, dépourvues d'exosporium. Les cellules ont cependant une paroi épaisse,

des mésosomes et un septum persistant, caractéristiques des bactéries à Gram positif. Le métabolisme est obligatoirement respiratoire; en anaérobiose, les composés suivants sont utilisés comme accepteurs d'électrons : NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ et fumarate. Les nitrates, les nitrites et l'oxyde nitreux sont dénitrifiés avec production de N_2 . La réaction à l'oxydase est positive. Le GC % de l'ADN est de 39. Cette bactérie peut être considérée comme une nouvelle espèce : *Bacillus azotoformans* n. sp.

MOTS-CLÉS : *Bacillus*, *Bacillus azotoformans* n. sp., Sol, Dénitrification.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Mme A. Ryter (Institut Pasteur, Paris) et à M. F. Mayer (Institut für Mikrobiologie der Universität, Göttingen, République Fédérale Allemande) qui ont réalisé les examens au microscope électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DE BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai de classification biochimique de 64 *Bacillus* des groupes II et III représentant 11 espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, 122, 463-473.
- [2] DELAPORTE, B., Trois nouvelles espèces de *Bacillus* : *Bacillus similibadius* n. sp. *Bacillus longisporus* n. sp. *Bacillus nitritallens* n. sp. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, 123, 821-834.
- [3] ELSTNER, E. F. & HEUPEL, A., Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal. Biochem.*, 1976, 70, 616-620.
- [4] GARCIA, J.-L., Réduction de l'oxyde nitreux dans les sels de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 79-84.
- [5] GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & HOR-NAY PANG, C., The genus *Bacillus*, U. S. Dep. Agric., 1973.
- [6] HERBERT, D., Catalase from bacteria (*Micrococcus lysodeikticus*), in « Methods in enzymology » (P. Colowick & N. O. Kaplan), 2, (p. 784-788), Academic Press Inc., New York, 1955.
- [7] HONG, M. M., SHEN, S. C. & BRAUNSTEIN, A. E., Distribution of L-alanine dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase in bacilli. *Biochem. biophys. Acta* (Amst.), 1959, 36, 288-289.
- [8] KLAUSHOFER, H. & HOLLAUS, F., Zur Taxonomie der hochthermophilen, in Zuckerfabrikssäften vorkommenden aeroben Sporenbildner. *Zeitsch. Zuckerindustrie*, 1970, 20, 465-470.
- [9] LAW, J. H. & SLEPECKY, R. A., Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bact.*, 1961, 82, 33-36.
- [10] LEMILLE, F., de BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe I, appartenant à 9 espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1969, 116, 808-819.
- [11] 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 Inc., New York, 1968.

- [12] 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.
- [13] PICHINOTY, F., La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur*, 1973, 71, 317-395.
- [14] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [15] 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.
- [16] SHEN, S. C., HONG, M. M. & BRAUNSTEIN, A. E., The main path of nitrogen assimilation in *Bacillus subtilis*. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 1959, 36, 290-291.
- [17] SKERMAN, V. B. D., A guide to the identification of the genera of bacteria, (p. 278-279), Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1967.
- [18] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271.
-