

INTRODUCTION

Il existe trois types de bactéries nitrato-réductrices : celles qui réduisent le nitrate avec production de gaz (N_2O et N_2), celles qui réduisent ce composé seulement jusqu'au stade du nitrite, et celles enfin qui réduisent le nitrite avec production de gaz, mais non le nitrate, et qui sont dites « nitrito-dépendantes ». Quelques espèces seulement de ce dernier type ont été décrites : 2 *Achromobacter* [8, 14], 1 *Alcaligenes odorans* var. *viridans* [3],

plusieurs *Pseudomonas* [13] et 1 *Flavobacterium* [10]. Vangnai et Klein [13]

Parallèlement, c'est-à-dire à l'aide de dilutions plus poussées provenant d'une même suspension de sol, des numérations des bactéries qui réduisent NO_3^- en NO_2^- ont été effectuées sur milieu non gélosé et additionné de nitrate (5 g/l), dans des tubes à essais de 12×120 mm munis de bouchons « Vacutainer » (Becton Dickinson, Grenoble) et mis en incubation sous vide, en milieu de base A pour les bactéries mésophiles et en milieu complexe B pour les bactéries thermophiles. Les tubes sont comptés comme positifs s'il y a apparition d'une coloration rose après addition du réactif de Griess en fin d'incubation (présence de nitrite).

Isolement de souches pures.

Des bactéries dénitrifiantes mésophiles tolérant 5 g/l de nitrite ont été isolées, soit en milieu de base A non gélosé, soit en milieu complexe B, à partir de sol sec ou fraîchement prélevé en sol nu ou dans la rhizosphère du riz. Des bactéries dénitrifiantes thermophiles ont été isolées en milieu complexe B non gélosé, à partir de sols secs, en présence de nitrate ou de nitrite (5 g/l).

Dans tous les cas, les incubations ont été effectuées sous vide, en ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Les étalements ont été réalisés sur gélose nutritive (Difco) en boîtes de Petri, et les souches conservées à 4° en tube incliné, sur gélose nutritive renforcée par l'addition de 10 g/l d'agar dans le cas des bactéries thermophiles.

Étude de la croissance.

La croissance de quelques-unes des souches isolées a été étudiée en anaérobiose (atmosphère de N_2) en milieu complexe B contenant des concentrations de nitrite comprises entre 0,05 et 0,6 %, à 37 ou 60°, à l'aide d'un biophotomètre enregistreur « Biolog II » (de Bonnet-Maury et Jouan, Jouan-Quétin, Paris).

Mesure de l'activité dénitrifiante.

En vue de la mesure de l'activité dénitrifiante des cellules lavées, les souches mésophiles choisies sont cultivées pendant 24 h à 30°, en anaérobiose, en milieu complexe B contenant 5 g/l de KNO_3 ou KNO_2 . La culture est ensuite centrifugée (20 min, 16 000 g) et les cellules sont lavées deux fois avec une solution de NaCl à 2 %, puis recueillies dans 10 ml de tampon phosphate 0,33 M, pH 7,0. Pour mesurer l'activité dénitrifiante, on utilise 1 ml de suspension bactérienne dans des flacons sérum de 125 ml contenant 25 ml de tampon et 50 mg de succinate de sodium. Les flacons sont mis sous vide pendant 5 min puis gazés à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide) ; l'opération est répétée trois fois. On introduit ensuite, à l'aide de seringues en plastique, 2 ml de krypton N35 qui sert d'étalon interne et l'un des quatre accepteurs d'électrons suivants : KNO_3 , 50 mg ; KNO_2 , 50 mg ; NO, 10 ml ; ou N_2O , 10 ml. Puis on place les flacons dans un bain-marie agité, à la température de 30°. Des analyses de l'atmosphère des flacons sont effectuées toutes les 30 min à l'aide d'un chromatographe à conductibilité thermique « Varian Aerograph 90 P4 » suivant les conditions décrites par ailleurs [5, 6].

Les résultats (deux répétitions) sont rapportés au mg d'azote total déterminé par micro-Kjeldahl.

La croissance de la souche thermophile choisie après isolement sur nitrite à 5 % est obtenue en milieu complexe B contenant 5 g/l de KNO_3 ou KNO_2 . Elle se produit à 55° en 21 h environ si l'on procède de la manière suivante : onensemence un ballon de 250 ml contenant 100 ml de milieu à partir d'une gélose inclinée (gélose nutritive, 23 g ; agar, 10 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml) âgées de 8 h environ. Après 8 h d'incubation anaérobie sous N_2 , onensemence un ballon de 2 l contenant 1,4 l de milieu ; cet ensemencement est réalisé automatiquement au cours de la nuit à l'aide d'un dispositif très simple : la sonnerie d'un réveil déclenche mécaniquement l'ouverture du tuyau de jonction entre les deux ballons. Après 5 h, on récolte

les cellules par centrifugation (14°, 20 min, 4 000 *g*) puis on les lave deux fois dans les mêmes conditions avec une solution saline [4] ; on les recueille enfin dans 10 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7,4 [4] ; la solution de lavage et le tampon sont maintenus à 55° avant usage. Lors de la mesure de l'activité dénitrifiante, on remplace le tampon phosphate et le succinate par le milieu complexe B sans accepteur d'électrons, contenant 100 μ g/ml de chloramphénicol et on effectue l'incubation

RÉSULTATS

I. — Numérations

La densité des bactéries dénitrifiantes mésophiles évaluée en milieu de base A dans 9 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite (D_2) par rapport à celles dénombrées sur nitrate (D_1) ; en effet, le rapport D_2/D_1 est dans tous les cas nettement supérieur à 1 (tableau I). Le nombre de bactéries mésophiles nitrate-réductrices produisant du nitrite (D_3) est très élevé par rapport à D_1 .

TABLEAU I. — Densité des bactéries mésophiles
(nombre par g de sol sec) dans des sols de rizière conservés à l'état sec,
évaluée en milieu de base A.

Origine des sols	D_1	D_2	D_3 (millions)	D_2/D_1	D_3/D_1
Bombate	2 400	50 000	200	11,7	84,110

à celles dénombrées sur nitrite (D_2) ; en effet, le rapport D_2/D_1 est le plus souvent inférieur à 1 ou voisin de 1 (tableau II). Le nombre de bactéries mésophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite (D_3) est, dans ce cas, toujours plus élevé que celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate (D_1), mais le rapport D_3/D_1 est plus faible, en général, que celui obtenu pour les sols conservés à l'état sec. Le rapport des densités de bac-

TABLEAU II. — Densité des bactéries mésophiles (nombre par g de sol sec) dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R) à partir d'échantillons frais de sols de rizière de la vallée du fleuve Sénégal, évaluée en milieu de base A.

Origine des sols		D_1	D_2	D_3 (millions)	D_2/D_1	D_3/D_1
Boundoum Nord	S	79 500	4 500	102	0,06	1 283
	R	405 000	24 000	1,012	0,06	2,5
Richard-Toll Canal D-1	S	1 062 000	106 000	6,195	0,10	5,8
	R	47 000	47 000	339,6	1,00	7 225
Savoigne 1	S	359 000	18 000	202	0,05	562
	R	986 000	47 900	507	0,05	514
Richard-Toll Canal D-2	S	68 500	13 700	2,74	0,20	40
	R	22 000	73 500	5	3,34	227
Savoigne 2	S	290 900	30 900	0,454	0,11	1,5
	R	174 800	116 500	68	0,67	389
Boundoum barrage	S	106 000	14 000	136,4	0,13	1 287
	R	522 000	134 000	89,5	0,25	171,5
Balky	S	1 224 500	184 000	9,2	0,15	7,5
	R	69 000	7 000	0,495	0,10	7,2
Kassack Sud	S	2 195 000	170 700	73,2	0,08	33,3
	R	2 222 000	5 000 000	500	2,25	225
Grande digue	S	103 450	163 800	51,7	1,58	500
	R	51 700	86 200	155,2	1,67	3 002
Ross-Béthio	S	11 480	147 600	8,2	12,86	714,3
	R	21 840	109 200	45,5	5,00	2 083
Dagana	S	309 400	200 200	31,85	0,65	103
	R	22 120	189 600	55,3	8,57	2 500
Fanaye	S	707 000	353 500	323,2	0,50	457
	R	220 400	394 400	371,2	1,79	1 684

D_1 , D_2 et D_3 : cf. légende du tableau I.

téries dénombrées dans la rhizosphère et le sol nu (R/S) est variable suivant les sols dans le cas des ensembles D_1 et D_2 mais le plus souvent supérieur à 1 dans le cas de l'ensemble D_3 (tableau III).

TABLEAU III. — Rapport des densités de bactéries mésophiles dénombrées dans la rhizosphère du riz et le sol nu (R/S).

Origine des sols	D_1	D_2	D_3
Boundoum Nord	5,0	5,3	0,01
Richard-Toll Canal D1	0,04	0,4	54,8
Savoigne 1	2,7	2,7	2,5
Richard-Toll Canal D-2	0,3	5,4	1,8
Savoigne 2	0,6	3,8	149,6
Boundoum barrage	4,9	9,6	1,9
Balky	0,1	0,04	0,2
Kassack Sud	1,0	29,3	6,8
Grande digue	0,5	0,5	3,0
Ross-Béthio	1,9	0,7	5,5
Dagana	0,07	0,9	1,7
Fanaye	0,3	1,1	1,1

D_1 , D_2 et D_3 : cf. légende du tableau I.

Comparons les densités des bactéries dénitrifiantes mésophiles dénombrées en milieu de base A et en milieu complexe B dans des sols conservés à l'état sec. On observe une augmentation des valeurs des ensembles D_1 et D_2 , le premier de ceux-ci augmentant moins que le second (tableau IV). Des observations similaires ont été faites avec des sols fraîchement prélevés (tableau IV).

La densité des bactéries dénitrifiantes thermophiles évaluée en milieu complexe B dans 18 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une très nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite (DT_2) par rapport à celles dénombrées sur nitrate (DT_1) ; en effet, le rapport DT_2/DT_1 n'est qu'une seule fois inférieur à 1 et atteint une valeur maximale de 1.120 (tableau V). Le nombre de bactéries thermophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite (DT_3) est presque toujours supérieur à celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate (DT_1), mais le rapport DT_3/DT_1 est nettement plus faible que celui obtenu avec les bactéries mésophiles dénombrées sur sol sec.

TABLEAU IV. — Comparaison, dans des sols de rizière conservés à l'état sec ou fraîchement prélevés, des densités de bactéries dénitrifiantes mésophiles (nombre par g de sol sec) obtenues en milieu de base A et milieu complexe B.

Nature et origine des sols		Milieu de base A			Milieu complexe B			B/A		
		D ₁	D ₂	D ₂ /D ₁	D ₁	D ₂	D ₂ /D ₁	D ₁	D ₂	
Sols secs	Goudomp	3 400	2 600	0,76	30 000	500 000	16,70	8,8	192,3	
	Bounkilinn	9 000	6 000	0,66	350 000	240 000	0,68	38,8	40,0	
	Kalaban	4 000	2 200	0,55	170 000	500 000	2,90	42,5	227,3	
Sols frais	Richard-Toll Canal D-1	S	1 062 000	106 200	0,10	323 800	152 400	0,47	0,3	1,4
		R	47 000	47 000	1,00	2 058 000	882 300	0,42	438,0	187,7
	Savoigne 1	S	359 000	18 000	0,05	218 400	2 069 000	9,47	0,6	114,9
		R	986 000	47 900	0,05	2 528 700	1 609 200	0,63	2,5	33,6

D₁ et D₂ : cf. légende du tableau I.
 S = sol nu.
 R = rhizosphère du riz.

II. — Isolement de souches pures dénitrifiantes nitrito-tolérantes

Nous avons isolé 44 souches pures dénitrifiantes mésophiles en présence de nitrite à 5 ‰ à partir de sols de rizière du Sénégal conservés à l'état

TABLEAU V. — Densité des bactéries thermophiles
(nombre par g de sol sec) dénombrées en milieu complexe B
dans des sols de rizière conservés à l'état sec.

Origine des sols	DT ₁	DT ₂	DT ₃	DT ₂ /DT ₁	DT ₃ /DT ₁
Bambato	1 600	180 000	14 000	112,5	8,7
Bema	350	12 000	3 400	34,3	9,7
Boundoum Nord	25	3 500	14 000	140,0	560,0
Bounkilinn	2 200	5 000	240 000	2,3	109,0
Diango	130	800	12 000	6,2	92,3
Djibelor	7 000	10 000	120 000	1,4	17,1
Kamobeul	110	2 200	800	20,0	7,3
Kassack	400	400	40 000	1,0	100,0
Loudia	50	280	4 000	5,6	80,0
M'Bang	250	36 000	1 200	144,0	4,8
Niaguise	22 000	7 000	120 000	0,3	5,5
Oussouye	5 000	70 000	22 000	14,0	4,4
Richard-Toll CSS	60	5 000	18 000	83,4	300,0
Richard-Toll Canal D	170	2 800	1 000	16,5	5,9
Rindiao	25	28 000	400	1 120,0	16,0
Sébkotane	17 000	180 000	40 000	10,6	2,3
Tanaff	7 000	320 000	1 200	45,7	0,2
X	35	10 000	1 000	285,7	28,6

DT₁ = bactéries dénombrées sur nitrate et produisant du gaz.
DT₂ = bactéries dénombrées sur nitrite à 5‰ et produisant du gaz.
DT₃ = bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite.

souches isolées sur nitrate sont capables de croître en anaérobiose sur nitrite à 5 ‰.

Toutes ces souches pures sont actuellement en cours d'étude en vue de leur identification.

III. — Étude de la croissance

Les souches étudiées ont été choisies en fonction de leur comportement à l'égard du nitrite. Les résultats sont représentés sur la figure 1. La souche nitrito-faiblement tolérante, sporulée, ne présente pas de croissance en 48 heures dans le 2/10 de nitrite, mais elle croît dans le 1/10 de nitrite.

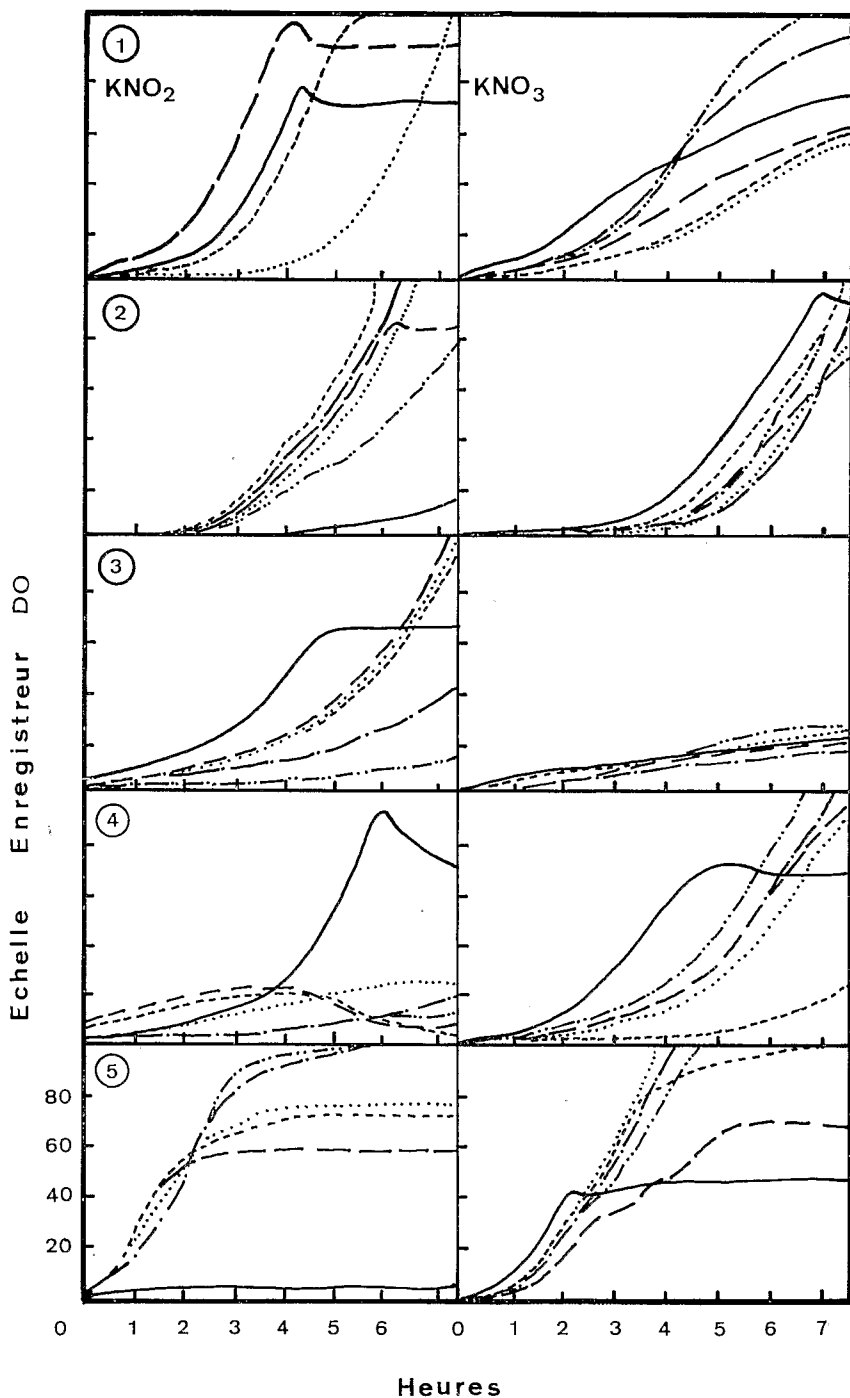


FIG. 1 — Étude au biophotomètre de la croissance des souches caractéristiques, en anaérobiose, sur KNO_3 ou KNO_2 comme substrat respiratoire.

1) Bactérie faiblement nitrito-tolérante ; 2) bactérie fortement nitrito-tolérante ; 3) bactérie « nitrito-dépendante » ; 4) *B. azotoformans* ; 5) bactérie thermophile.

Concentrations : — = 0,5 g/l ; - - = 1,0 g/l
 - - - = 2,0 g/l ; . . . = 3,0 g/l
 - · - = 5,0 g/l ; - · - · = 6,0 g/l.

croissance sur nitrate est moins rapide. La souche « nitrito-dépendante », non sporulée, tolère bien le nitrite mais ne présente qu'une croissance très faible sur nitrate. La souche de *Bacillus azotoformans* [11] n'a poussé qu'en présence de 0,5 g/l de nitrite. Enfin, la souche thermophile sporulée, isolée sur nitrite, croît bien en présence de nitrite à 6 ‰.

IV. — *Mesure de l'activité dénitrifiante*

Le tableau VI rend compte des activités nitrate-, nitrite-, oxyde nitrique- et oxyde nitreux-réductases maximales des cellules lavées de bactéries mésophiles, après culture anaérobie sur nitrate ou nitrite à 5 ‰. Rapportées au mg d'azote, ces activités sont en général plus élevées pour les cellules issues d'une culture sur nitrite dans le cas des bactéries nitrito-

TABLEAU VI. — Activité dénitrifiante maximale (μl de gaz accumulé/mg N/h) des cellules lavées de bactéries mésophiles, mesurée à 37° par chromatographie en phase gazeuse.

Souche	Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	Gaz accumulés		
			NO	N ₂ O	N ₂
Bactérie fortement nitrito-tolérante	nitrate	NO ₃ ⁻	0	0	74
		NO ₂ ⁻	0	0	159
		NO	—	0	48
		N ₂ O	—	—	352
	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	55
		NO ₂ ⁻	0	0	445
		NO	—	0	153
		N ₂ O	—	—	770
Bactérie faiblement nitrito-tolérante	nitrate	NO ₃ ⁻	0	25	34
		NO ₂ ⁻	0	49	0
		NO	—	35	22
		N ₂ O	—	—	40
	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	78
		NO ₂ ⁻	0	0	73
		NO	—	157	19
		N ₂ O	—	—	191
Bactérie « nitrito-dépendante »	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	0
		NO ₂ ⁻	0	0	76
		NO	—	82	0
		N ₂ O	—	—	34
<i>B. azotoformans</i>	nitrate	NO ₃ ⁻	0	180	305
		NO ₂ ⁻	0	356	280
		NO	—	0	101
		N ₂ O	—	—	397

Tableau VII. — Activité dénitrifiante maximale
des cellules thermophiles lavées,
mesurée à 60° par chromatographie en phase gazeuse.

Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	µl de gaz accumulé/mg N/h		
		NO	N ₂ O	N ₂
nitrate	NO ₃ ⁻	0	0	89
	NO ₂ ⁻	78	17	116
	NO	—	46	46
	N ₂ O	—	—	767
nitrite	NO ₃ ⁻	0	409	1 135
	NO ₂ ⁻	0	0	2 275
	NO	—	0	600
	N ₂ O	—	—	5 070

Cette population de bactéries nitrito-tolérantes est très diversifiée puisqu'on y rencontre des germes incapables de réduire NO₃⁻, des germes oxyde nitrique-tolérants qui croissent en présence de NO et des germes oxyde nitreux-déficients incapables de croître en présence de N₂O. La tolérance envers le nitrite varie suivant les souches, et l'on peut distinguer des bactéries nitrito-fortement tolérantes qui croissent rapidement en présence de 5 g/l de KNO₂ et des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l.

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. Toutes les souches croissent en présence de nitrite à concentration élevée. Ces bactéries thermophiles sont toutes sporulées et appartiennent au genre *Bacillus* ; leur étude détaillée est en cours, mais le groupe apparaît déjà très hétéro-

RÉSUMÉ

Des numérations de bactéries dénitrifiantes mésophiles et thermophiles ont été effectuées dans des sols de rizière du Sénégal à l'aide de nitrate ou de nitrite à concentration élevée (5 g/l) comme substrat respiratoire. Elles ont révélé l'existence de deux populations de bactéries.

1) On observe une population de bactéries dénitrifiantes mésophiles, tolérant des concentrations élevées de nitrite. Ces organismes sont en majorité sporulés et relativement nombreux dans ces sols. Des études de croissance ont démontré leur grande diversité : *a*) des bactéries « nitrito-dépendantes » incapables de réduire NO_3^- ; *b*) des bactéries fortement nitrito-tolérantes, qui présentent une croissance rapide en présence de 5 g/l de KNO_2 ; *c*) des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l de KNO_2 ; *d*) des bactéries NO -tolérantes, utilisant pour leur croissance l'oxyde nitrique comme substrat respiratoire ; *e*) des bactéries N_2O -déficientes, incapables de croître en présence de N_2O .

2) On observe, de plus, une population de bactéries dénitrifiantes thermophiles sporulées, nombreuses dans certains sols, et qui tolèrent plus ou moins bien le nitrite.

Des mesures de l'activité dénitrifiante de cellules lavées ont montré qu'en général les cellules issues d'une culture anaérobie sur nitrite ont une activité nettement plus grande que celle des cellules issues d'une culture anaérobie avec nitrate. Cette population nitrito-tolérante semble assez hétérogène, mais elle comprend principalement des espèces sporulées appartenant au genre *Bacillus*.

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Sol, Nitrite ; Mésophilie, Thermophilie, *Bacillus* ; Rizière, Sénégal.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à MM M. Mouraret et F. Pichinoty pour leurs conseils ainsi qu'à MM J. Bakhoum et C. Barrier pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOLLAG, J. M., ORCUTT, M. L. & BOLLAG, B., Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, 34, 875-879.
- [2] BOVELL, C., The effect of sodium nitrite on the growth of *Micrococcus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 1967, 59, 13-19.
- [3] CHATELAIN, R., Réduction du nitrite par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. *Ann. Inst. Pasteur* 1969, 116, 498-500.

- [4] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, 91, 634-641.
- [5] 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.
- [6] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 1975, 7, 251-256.
- [7] GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P., Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physicochimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 1974, 11, 169-185.
- [8] GAWEL, L. J., The respiration characteristics of Ocean Bay sediments and selected marine isolates. Doct. Thesis Oregon State Univ., Corvallis.
- [9] PAYNE, W. J., Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bact. Rev.*, 1973, 37, 409-452.
- [10] PICHINOTY, F., BIGLIARDI-ROUVIER, J., MANDEL, M., GREENWAY, B., METENIER, G. & GARCIA, J.-L., The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1976, 42, 349-354.
- [11] PICHINOTY, F., de BARJAC, H., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J.-L., Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : *Bacillus azotiformans* n. sp. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127 B, 351-361.
- [12] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-171.
- [13] VANGNAI, S. & KLEIN, D. A., A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 335-339.
- [14] YOUATT, J. B., Denitrification of nitrite by a species of *Achromobacter*. *Nature (Lond.)*, 1954, 173, 826-827.