

## ÉTUDE DE LA DÉNITRIFICATION CHEZ UNE BACTÉRIE THERMOPHILE SPORULÉE

par J.-L. Garcia

Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM, BP 1386, Dakar (Sénégal)

### SUMMARY

#### DENITRIFICATION IN A SPORULATING THERMOPHILIC BACTERIUM

Denitrification in a thermophile isolated on nitrite containing-medium (5 g/l) was studied by means of Warburg respirometry and gas chromatography. This strain seems to denitrify nitrite more rapidly than nitrate. Extracts of cells grown anaerobically on nitrate have dissimilatory nitrate reductase (type A); extracts of cells grown aerobically without nitrate have raised levels of the two types of nitrate reductase A and B. The optimal temperature for enzyme A activity is 60° C. Nitrite reductase activity was measured using yeast extract as electron donor. For nitric oxide reductase activity, yeast extract is as efficient an electron donor as sodium lactate. Nitrous oxide reductase activity was found only in the 4 000 g supernatant showing the particulate nature of the enzyme. A mixture of FAD, FMN and NADH served as electron donor. Using acetylene as an inhibitor of nitrous oxide reduction in both whole cells and extracts, we showed that this gas is an intermediate compound in the reduction of NO to N<sub>2</sub>.

KEY-WORDS: Denitrification, Reductase, Thermophily; Sporulating bacterium, Soil.

### INTRODUCTION

Les bactéries dénitrifiantes thermophiles ont été relativement peu étudiées. Ambroz, le premier, a isolé en 1913 un bacille sporulé qu'il nomma *Denitrobacterium thermophilum* [1]. Au cours d'une étude systématique du genre *Bacillus*, Smith, Gordon et Clark [21] n'ont trouvé que 4 souches

Manuscrit reçu le 14 décembre 1976, accepté le 23 avril 1977.

Ann. Microbiol. (Inst. Past.), 128 A, n° 4, 1977.

= 2 NOV. 1977

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

Collection de Référence

n° 8842 Bio.Sols

dénitrifiantes sur 216 appartenant à l'espèce *B. stearothermophilus*. En 1968, Wolff et Barker [22] ont proposé de scinder cette espèce en trois groupes : seules les souches du groupe 1 (*B. kaustophilus* ou *B. thermodenitrificans*) réduisent le nitrate avec production de gaz. De Barjac et Bonnefoi [4] n'ont pas trouvé de différences notables entre les 5 souches dénitrifiantes de *B. stearothermophilus* qu'ils ont étudiées ; leurs observations corroborent celles de Smith et coll. [21].

Nous avons isolé à partir de sols de rizière du Sénégal une quarantaine de bactéries dénitrifiantes thermophiles. L'une de celles-ci a été étudiée dans le but de préciser la séquence des produits de la dénitrification.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Microorganisme.*

La souche TnBA<sub>1</sub> a été isolée à 65° à partir d'un sol de rizière de Casamance (Sénégal), par culture d'enrichissement en milieu complexe [5] renfermant 5 g/l de KNO<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons. C'est un bacille sporulé immobile, à spore ovale et déformante, oxydase<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, qui semble correspondre à l'espèce *B. thermodenitrificans* [22] puisqu'il ne croît pas en milieu complexe contenant 3 % de NaCl, n'hydrolyse ni la gélatine ni l'amidon, ne forme pas d'acétyl-méthylcarbinol ni d'indole, et produit de l'acide en anaérobiose sur arabinose, mannitol et xylose sans en produire sur lactose, rhamnose et cellobiose. Cependant, contrairement à la définition de l'espèce *B. stearothermophilus* [4] qui englobe le groupe *B. thermodenitrificans*, la souche TnBA<sub>1</sub> croît bien sur gélose nutritive à pH 6.

### *Cultures.*

Toutes les cultures ont été faites à 55°. Pour obtenir des suspensions cellulaires, nous avons utilisé le même milieu que celui qui a servi à l'isolement [5] et procédé de la manière suivante. A partir d'une gélose inclinée (agar nutritif Difco 23 σ :

*Réduction des oxydes de l'azote par les suspensions cellulaires.*

La réduction du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitrique et de l'oxyde nitreux par les cellules lavées, a été étudiée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. On utilise 1 ml de suspension bactérienne dans des flacons sérum de 125 ml contenant 25 ml du milieu de culture sans accepteur d'électrons, 1 ml d'une solution de chloramphénicol (concentration finale : 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Les flacons sont mis sous vide pendant 5 min puis gazés à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide, Paris) ; 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 4 composés azotés suivants :  $\text{KNO}_3$ , 50 mg ;  $\text{KNO}_2$ , 50 mg ; NO, 10 ml ; ou  $\text{N}_2\text{O}$ , 10 ml. Puis on met les flacons en incubation à 60° dans un bain-marie agité. Des analyses de l'atmosphère des flacons sont effectuées toutes les 40 min pendant 3 h à l'aide d'un chromatographe à conductibilité thermique « Varian Aerograph » 90 P4, suivant les conditions décrites ailleurs [8, 9]. Les résultats — deux répétitions — sont rapportés au mg d'azote total déterminé par microkjeldhal.

*Mesure des activités enzymatiques.*

L'activité nitrate-réductase a été mesurée à 60° par une méthode manométrique [20] avec le benzyl-viologène comme donneur d'électrons. Les amines aromatiques utilisées habituellement comme donneurs d'électrons pour doser la nitrite-réductase dissimilatrice, n'ont pu être employées ici car elles donnent lieu à une réaction chimique importante avec le nitrite à 60°. L'extrait de levure « Difco » a été utilisé comme donneur d'électrons [17]. La réduction de l'oxyde nitrique a été mesurée au chromatographe à l'aide du lactate de sodium [18] ou de l'extrait de levure comme donneurs d'électrons, dans des fioles de 13 ml incubées dans un bain-marie à agitation à 60° et munies d'un septum ; elles contiennent : tampon phosphate 0,066 M pH 7,4, 1 ml ; lactate de sodium 0,5 M, 0,3 ml ; extrait, 1 ml ; NO, 1 ml ; krypton, 0,2 ml ; atmosphère d'hélium pur. On mesure l'activité oxyde nitreux-réductase au chromatographe à 60° en utilisant l'extrait de levure à concentration élevée (10 %) ou le mélange FAD, FMN et NADH [19] comme donneurs d'électrons ; l'acétylène (10 % de la phase gazeuse) a été utilisé comme inhibiteur de l'enzyme [3, 23].

## RÉSULTATS

1) *Étude de la dénitrification par les suspensions cellulaires*

Nous n'avons jamais trouvé d'activité dénitrifiante lorsque les cellules lavées étaient remises en suspension dans du tampon phosphate 0,066 M contenant l'un des composés suivants comme donneur d'électrons : glucose, saccharose, DL-lactate et succinate. Par contre, une activité significative se manifeste lorsque l'on emploie le milieu de culture additionné de 100  $\mu\text{g/ml}$  de chloramphénicol et l'un des quatre accepteurs d'électrons :  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KNO}_2$ , NO ou  $\text{N}_2\text{O}$ .

Les résultats (tableau I) ont été obtenus après croissance de la souche en présence de nitrate ou de nitrite (aux concentrations de 2 et 5 ‰) ou de  $\text{N}_2\text{O}$ . Une accumulation de NO a pu être observée dans le cas de  $\text{NO}_2^-$  avec des cellules provenant d'une culture anaérobie avec nitrate. D'autre part, l'oxyde nitrique est réduit à une vitesse beaucoup plus grande lorsque les cellules proviennent d'une culture sur nitrite à haute

TABLEAU I. — Activité dénitrifiante à 60°  
des suspensions cellulaires (vitesses maximales)  
après croissance anaérobie à 55°.

Culture anaérobie avec	Accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/mg N/h}$			Réduction $\mu\text{l gaz/mg N/h}$	
		NO	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>	NO	N <sub>2</sub> O
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	89	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	78	17	116	—	—
	NO	—	46	46	115	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	767	—	744
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> à 2 ‰	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	195	472	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	1 050	—	—
	NO	—	22	289	394	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	2 526	—	2 593
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> à 5 ‰	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	409	1 135	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	2 275	—	—
	NO	—	0	600	1 445	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	5 070	—	5 041
N <sub>2</sub> O	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0	0	40	—	—
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	0	35	—	—
	NO	—	0	78	—	—
	N <sub>2</sub> O	—	—	1 758	—	1 776

concentration. L'accumulation de N<sub>2</sub>O est souvent transitoire car l'activité oxyde nitreux-réductase des cellules est très élevée, surtout dans le cas d'une culture sur nitrite ou N<sub>2</sub>O. La production de N<sub>2</sub> est beaucoup plus importante avec les cellules provenant d'une culture sur nitrite à haute concentration.

En utilisant l'acétylène (10 % de la phase gazeuse) comme inhibiteur de la réduction de N<sub>2</sub>O, on observe l'accumulation de ce gaz quel que soit l'accepteur d'électrons, la production de N<sub>2</sub> étant considérablement réduite. La figure 1 représente l'influence de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> sur l'activité dénitrifiante de cellules provenant d'une culture anaérobie sur nitrite à 5 ‰ ; l'acétylène n'inhibe que la réduction de N<sub>2</sub>O.

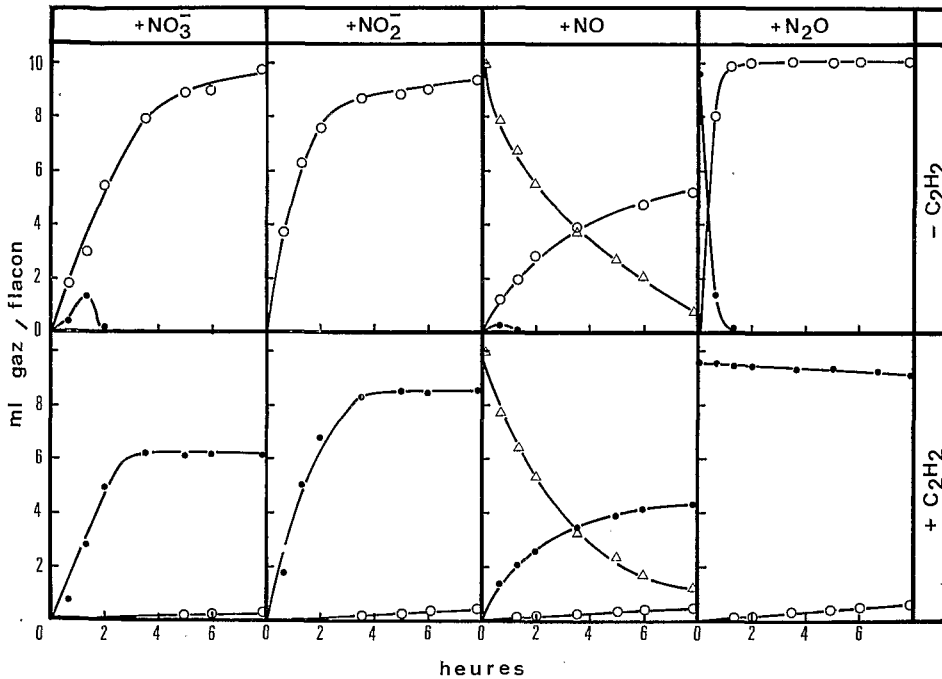


FIG. 1. — Influence de l'acétylène sur l'accumulation des composés gazeux de la dénitrification par une suspension cellulaire issue d'une culture anaérobie avec nitrite à 5 ‰

Incubation : bain-marie agité à 60°.

—△— : NO ;

—●— : N<sub>2</sub>O ;

—○— : N<sub>2</sub>.

## 2) Activités enzymatiques

### a) Nitrate-réductase.

Les nitrate-réductases A et B ont été recherchées dans les extraits provenant respectivement d'une culture anaérobie avec nitrate et d'une culture aérobie sans nitrate. Dans le premier cas, seule la nitrate-réductase de type A a été identifiée. Dans le second cas, nous avons trouvé les enzymes A et B. D'autre part, nous avons constaté un niveau de base relativement élevé pour les deux enzymes lorsque la bactérie croît en aérobiose et en l'absence de nitrate : cette activité est seulement 15 fois plus faible que celle des cellules induites en anaérobiose (tableau II). L'activité maximale se situe au voisinage de 60° (fig. 2). Nous avons également mesuré l'activité des extraits provenant de cultures sur nitrite et sur N<sub>2</sub>O : elle est nettement plus faible que celle obtenue sur nitrate (tableau III).

### b) Nitrite-réductase.

La concentration d'extrait de levure qui permet d'obtenir une activité maximale est très élevée et comprise entre 5 et 10 % (fig. 3 B). D'autre

part, l'activité nitrite-réductase est proportionnelle à la concentration d'enzyme (fig. 3 A). L'influence des conditions de culture sur l'activité spécifique des extraits est indiquée dans le tableau III.

c) *Oxyde nitrique-réductase.*

L'activité oxyde nitrique-réductase a été mesurée au chromatographe à 60° avec le lactate de sodium comme donneur d'électrons. Ce gaz est réduit

TABLEAU II. — Activités spécifiques nitrate- et chlorate-réductases des extraits, exprimées en  $\mu$ moles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Activité spécifique	Culture aérobie sans $\text{NO}_3^-$	Culture anaérobie avec $\text{NO}_3^-$
$V(\text{NO}_3^-)$	13,5	214
$V(\text{ClO}_3^-)$	8,7	278
$V(\text{ClO}_3^-)/V(\text{NO}_3^-)$	0,64	1,30

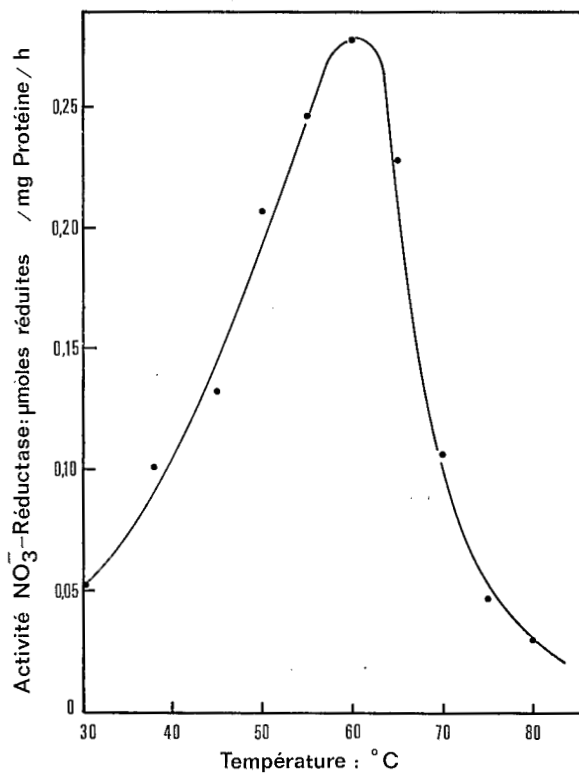


FIG. 2. — Influence de la température sur l'activité nitrate-réductase.

jusqu'au stade de  $N_2O$ . L'activité la plus faible a été observée avec les cultures sur  $N_2O$  (tableau III).

d) *Oxyde nitreux-réductase.*

L'activité de l'oxyde nitreux-réductase a pu être mesurée au chromatographe à  $60^\circ$ , à l'aide du mélange FAD, FMN et NADH. Cette enzyme

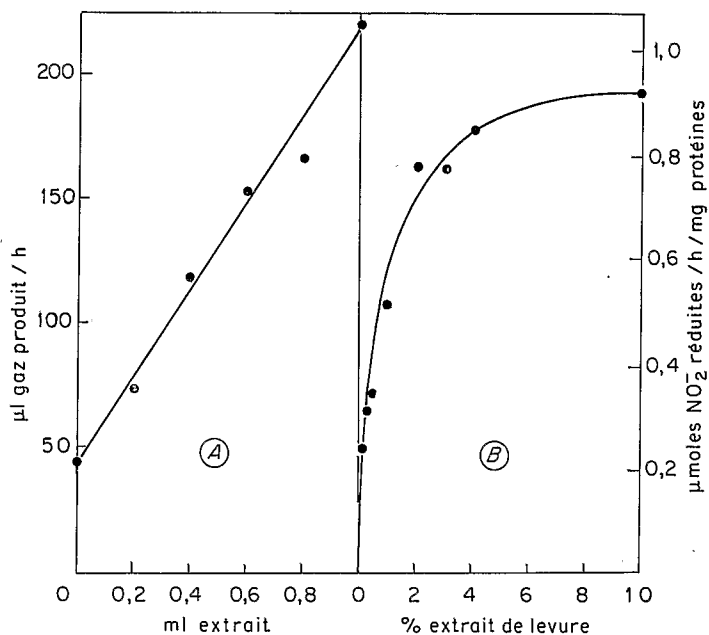


FIG. 3. — Influence des quantités d'extraits (A) et d'extrait de levure (B) sur l'activité nitrite-réductase à  $60^\circ$ .

Fliale : tampon phosphate 0,33 M, pH 7,4, 1 ml ; extrait de levure, 0,2 ml ; extrait d'une culture anaérobie avec  $KNO_3$ , x ml. Diverticule :  $KNO_2$  0,25 M, 0,2 ml. Puits central : KOH 40 %, 0,2 ml. Volume total de la phase liquide amené à 3 ml avec de l'eau. Phase gazeuse :  $N_2$  pur.

TABLEAU III. — Activités spécifiques mesurées à  $60^\circ$  des extraits provenant de cultures anaérobies avec nitrate, nitrite ou oxyde nitreux et exprimées en  $\mu$ moles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Activité enzymatique	Extrait d'une culture avec		
	$NO_3^-$	$NO_2^-$	$N_2O$
Nitrate-réductase	475	214	140
Nitrite-réductase	2,60	1,76	0,70
Oxyde nitrique-réductase	1,00	1,50	0,15
Oxyde nitreux-réductase	0,19	0,22	1,19

doit être liée à de très grosses particules puisqu'elle sédimente au-delà de 4 000 *g*. L'oxyde nitreux est réduit équimoléculairement en N<sub>2</sub>. En présence d'acétylène, la production de N<sub>2</sub> est fortement inhibée. L'activité oxyde nitreux-réductase est nettement plus élevée dans le cas des cultures anaérobies avec N<sub>2</sub>O que dans le cas de cultures anaérobies avec nitrate ou nitrite (tableau III).

e) *Utilisation de l'extrait de levure comme donneur d'électrons par les différentes enzymes.*

En utilisant l'extrait de levure à concentration élevée (10 %), nous avons pu mesurer l'activité des enzymes de la dénitrification à l'aide du respiromètre de Warburg pour les nitrate-et nitrite-réductases et de la chromatographie en phase gazeuse pour l'oxyde nitrique-et l'oxyde nitreux-réductases (tableau IV). Si l'on ajoute à la fois l'extrait de levure et le mélange FAD, FMN et NADH, on obtient, avec NO<sub>2</sub><sup>-</sup> comme substrat respiratoire et un extrait (surnageant à 4 000 *g*) provenant d'une culture anaérobie sur nitrite à 5 ‰, les trois composés gazeux habituels de la dénitrification, NO, N<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub>, ce dernier gaz constituant le produit ultime de la réaction (fig. 4 A). En présence d'acétylène à 10 %, la production de N<sub>2</sub> est fortement inhibée (fig. 4 B).

TABLEAU IV. — Activités spécifiques d'un extrait provenant d'une culture anaérobie avec nitrate, mesurées à 60° avec l'extrait de levure (10 %) comme donneur d'électrons et exprimées en μmoles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Enzyme	Activité spécifique
Nitrate-réductase	0.83



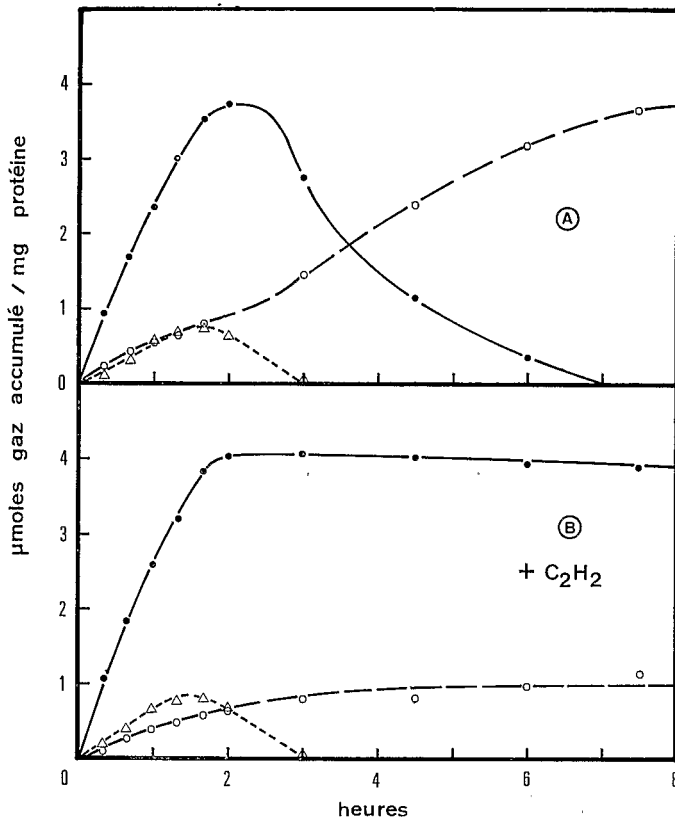


FIG. 4. — Influence de l'acétylène sur l'accumulation des composés gazeux de la dénitrification par un extrait (surnageant à 4 000 g) provenant d'une culture anaérobie avec nitrite à 5 ‰.

Extrait, 1 ml (16,75 mg protéine) ; extrait de levure, 0,3 g (0,4 ml) ; FMN et FAD, 0,5 µmole (0,2 ml) ; NADH, 1 µmole (0,2 ml). Incubation : en anaérobiose à 60° sous He ; Kr, 0,2 ml ;  $C_2H_2$ ,  $\pm 1$  ml (10 % de la phase gazeuse) ;  $KNO_2$  0,25 M, 0,2 ml (introduit au temps zéro à l'aide d'une seringue).

--△-- : NO ;

—●— :  $N_2O$  ;

—○— :  $N_2$ .

[7] n'ont pas trouvé d'activité dans les cultures aérobies sans nitrate de *B. stearotherophilus*. Les cultures étant réalisées à 55°, la teneur en oxygène du milieu est assez faible car la solubilité de ce gaz est réduite à température élevée : cela explique au moins en partie le niveau de base élevé

pour l'oxyde nitrique-réductase ; avec le lactate, la fraction soluble à 4 000 g accumule  $N_2O$  dans la phase gazeuse, tandis qu'avec l'extrait de levure on observe une accumulation de  $N_2$ , l'oxyde nitreux représentant un stade transitoire.

Nous avons vu que l'oxyde nitreux-réductase est solidaire de particules ayant une taille élevée. Payne et coll. [19] ont été les premiers à démontrer ce fait chez une bactérie mésophile, *Pseudomonas perfectomarinus*, en introduisant une méthode originale de mesure par l'emploi du mélange FAD, FMN et NADH comme donneur d'électrons. Avant eux, Matsubara [13, 14] et Matsubara et Mori [16] chez *P. denitrificans*, ainsi que Matsubara et Iwasaki [15] chez *Alcaligenes faecalis*, n'avaient pas réussi à mesurer cette activité dans un extrait.

En règle générale, nous avons constaté que l'activité des enzymes de la dénitrification était maximale quand il s'agissait d'extraits provenant d'une culture contenant l'inducteur. Pour l'oxyde nitrique-réductase, le meilleur inducteur est le nitrite, la bactérie ne se développant pas sur NO. Dans tous les cas, quel que soit l'accepteur d'électrons présent dans le milieu de culture, nous avons constaté l'induction séquentielle de toutes les enzymes de la dénitrification.

Enfin, l'emploi de l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de  $N_2O$  nous a permis de montrer, aussi bien avec des cellules entières qu'avec des extraits, que l'oxyde nitreux constitue un intermédiaire entre NO et  $N_2$  chez cette bactérie thermophile. Cela avait été déjà établi chez plusieurs autres bactéries dénitrifiantes [2, 12, 15, 19].

## RÉSUMÉ

La dénitrification par une bactérie dénitrifiante thermophile isolée sur nitrite (5 g/l) a été étudiée au respiromètre de Warburg et à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. Cette souche dénitrifie plus rapidement le nitrite que le nitrate. Les extraits provenant de cultures anaérobies avec nitrate possèdent la nitrate-réductase dissimilatrice de type A ; dans les extraits provenant de cultures aérobies sans nitrate, on trouve les nitrate-réductases de type A et B avec un niveau de base élevé. La température correspondant à l'activité maximale de l'enzyme A est de 60° C. L'activité nitrite-réductase a été mesurée à l'aide de l'extrait de levure comme donneur d'électrons. L'extrait de levure est un donneur d'électrons aussi efficace que le lactate de sodium pour l'oxyde nitrique-réductase. L'oxyde nitreux-réductase a été dosée en présence du mélange FAD, FMN et NADH ; elle se trouve solidaire de particules de taille élevée. L'emploi de l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de  $N_2O$  a permis de montrer, à l'aide de cellules entières et d'extraits, que ce gaz constitue une étape intermédiaire entre NO et  $N_2$ .

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Réductase, Thermophilie ; Bactérie sporulée, Sol.

## 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] AMBROZ, A., *Denitrobacterium thermophilum* spec. nova ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. *Cbl. Bakt.*, 1913, 37, 3-16.
- [2] BALDENSPERGER, J. & GARCIA, J.-L., Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 1975, 103, 31-36.
- [3] BALDERSTON, W. L., SHERR, B. & PAYNE, W. J., Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. env. Microbiol.*, 1976, 31, 504-508.
- [4] de BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai de classification biochimique de soixante-quatre *Bacillus* des groupes II et III, représentant onze espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, 122, 463-473.
- [5] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, 91, 634-641.
- [6] DOWNEY, R. J., KISZKISS, D. F. & NUNER, J. H., Influence of oxygen on development of nitrate respiration in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1969, 98, 1056-1062.
- [7] DOWNEY, R. J. & NUNER, J. H., Induction of nitrate reductase under conditions of nitrogen depletion. *Life Sci.*, 1967, 6, 855-861.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] KISZKISS, D. F. & DOWNEY, R. J., Localization and solubilization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1972, 109, 803-810.
- [11] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, 1951, 193, 265-275.
- [12] MATSUBARA, T., Studies on denitrification. — XII. Gas production from amines and nitrite. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1970, 67, 229-235.
- [13] MATSUBARA, T., Studies on denitrification. — XIII. Some properties of the  $N_2O$ -anaerobically grown cell. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1971, 69, 991-1001.

- [19] PAYNE, W. J., RILEY, P. S. & COX, C. D. Jr, Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bact.*, 1971, 106, 356-361.
- [20] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [21] SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E., Aerobic sporeforming bacteria. *Monogr. U. S. Dep. Agric.*, 1952, n° 16.
- [22] WOLF, J. & BARKER, A. N., The genus *Bacillus* : aids to the identification of its species, in « Identification method for microbiologists » (B. M. Gibbs & D. A. Shapton) part B, (p. 93-109), Academic Press, London, 1968.
- [23] YOSHINARI, T. & KNOWLES, R., Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 705-710.