

ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE ET TAXONOMIQUE DE *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*

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

Laboratoire de Biochimie Végétale, UER Scientifique de Luminy,
13288 Marseille Cedex 2 (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 PHYSIOLOGICAL AND TAXONOMIC STUDY OF « *PARACOCCLUS DENITRIFICANS* »

Four of the six strains studied are from a collection. The two others were isolated from soil by enrichment culture in a liquid minimal medium containing tartrate or succinate, under an N_2O atmosphere at 32° C.

Paracoccus denitrificans possesses a respiratory metabolism; nitrate, nitrite, nitrous oxide and oxygen are used as electron acceptors. The microorganism gives a positive oxidase test and possesses a cytochrome *c* and a catalase. It requires no growth factors. All six strains can use the following 27 sources of carbon and energy under aerobic conditions: D-glucose, D-fructose, D-ribose, D-mannitol, D-sorbitol, D-arabitol, L-arabitol, glycerol, methanol, ethanol, *n*-propanol, formate, acetate, propionate, butyrate, malonate, succinate, glycollate, L-lactate, D-lactate, pyruvate, sarcosine, L- α -alanine, β -alanine, asparagine, L-proline, and γ -aminobutyrate.

Five of the six strains can grow in minimal salts medium under an atmosphere of H_2 , N_2O (or O_2) and CO_2 . They are therefore chemo-organotrophs, methylotrophs and chemo-lithotrophs. They synthesize poly- β -hydroxybutyrate, cannot hydrolyze gelatin nor Tween 80. Nitrate is used as a source of nitrogen. Nitrate reductase A and respiratory nitrite reductase are present. Amylase, tetrathionate reductase and constitutive arginine dihydrolase are absent. Five of the six strains contain hydrogenase and L-phenylalanine deaminase. The degradation of aromatic compounds proceeds through an *ortho* cleavage of catechol or protocatechuate.

The DNA of five of the six strains has a G + C content between 66.3

23 MAI 1978

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

Collection de Référence

n° - 9152 Bio. Sols

and 67.3 %. One strain has a G + C content of 63.3 % and differs clearly from the others by 17 separate characters.

Denitrification was studied quantitatively with cell suspensions of one the strains. Cells grown anaerobically on NO_3^- reduce NO_3^- to N_2 , NO_2^- to N_2O and N_2 , N_2O to N_2 , and NO to N_2O and N_2 . Nitrous oxide is produced from NO_3^- but is rapidly reduced to N_2 . Cells grown anaerobically under N_2O reduce NO_3^- to N_2 , NO_2^- to N_2O and N_2 , N_2O to N_2 , and NO to N_2O and N_2 .

KEY-WORDS: *Paracoccus denitrificans*, Soil, Bacterial nutrition; Denitrification, Taxonomy.

INTRODUCTION

Paracoccus denitrificans est une espèce dénitrifiante hétérotrophe facultative qui croît, en aérobiose, aux dépens de H_2 comme source d'énergie et de CO_2 comme source de carbone [4, 5, 6]. Elle a été découverte en 1910 et dénommée *Micrococcus denitrificans* par Beijerinck et von Minkman [1]. Les souches qui figurent dans les collections sont peu nombreuses et elles ont presque toutes été isolées du sol dans le Laboratoire de Microbiologie de la « Technische Hogeschool » (Delft, Pays-Bas). Davis et coll. [4] ont étudié récemment en détails la souche type 381 (ATCC 17741, Technische Hogeschool, Delft) et la souche 443 dénommée initialement « espèce 5 de *Hydrogenomonas* » et isolée par A. Manten (Technische Hogeschool, Delft). Notre travail a porté sur six souches.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Microorganismes.*

Les souches 1, 2, 3 et 4 proviennent de la collection de la « Technische Hogeschool » (Delft, Pays-Bas). Elles ont été isolées respectivement par M. W. Beijerinck en 1910, par E. van Olden en 1939, par A. L. Koster en 1952 et par A. Fuchs en 1953.

Nous avons isolé les souches 5 et 6 à partir de terreau par culture d'enrichissement en milieu minimal [14] contenant 4 g/l de tartrate et de succinate de sodium respectivement, placé en incubation sous atmosphère de N_2O , à 32° C. Elles ont été déposées à la Collection de l'Institut Pasteur (souche 5, n° CIP 79-75 ; souche 6, n° CIP 104-75).

2) *Tests et essais enzymatiques.*

La plupart des tests appliqués au cours de ce travail sont ceux qui ont été employés par Stanier et coll. [18] lors de leur étude du genre *Pseudomonas*. La croissance chimio-lithotrophe a été étudiée à 32° en ballons de 250 ml contenant 10 ml du milieu de Doudoroff [18], remplis d'un mélange gazeux contenant 65 % de H_2 , 5 % de CO_2 , 24 % de N_2 et 6 % de O_2 ou de N_2O .

L'hydrogénase a été recherchée sur des cellules intactes par la technique manométrique de Warburg en présence de bleu de méthylène comme accepteur d'électrons. Les cultures sont faites en ballons de 3 l contenant 1 l de milieu (4 g/l d'extrait de levure) et une atmosphère contenant 50 % de H₂ et 50 % de N₂O. Après 48 h d'agitation à 32°, les cellules sont récoltées et lavées par centrifugation.

Les autres essais enzymatiques ont déjà été décrits [14]. L'étude de la dénitrification par les suspensions cellulaires a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, sous atmosphère d'hélium, en présence de succinate comme donneur d'électrons et à 37°.

La croissance de la souche 5 a été étudiée en fioles coniques de 1 l contenant 250 ml de milieu minimal [14], agitées dans un bain-marie à 37°. La concentration du formiate de sodium est de 1 % ; la concentration du méthanol, de l'éthanol et de l'acétate est de 0,5 %. La densité optique est mesurée à 450 nm dans des cuves ayant un passage lumineux de 10 mm à l'aide d'un spectrophotomètre « Jean et Constant ».

3) Composition en bases de l'ADN.

L'ADN a été extrait des cellules cultivées en milieu complexe [11]. La composition en bases a été calculée [17] à partir de la densité de flottation [12].

RÉSULTATS

I. — Nutrition carbonée

Les 27 substrats suivants sont utilisés, en aérobiose, comme sources de carbone et d'énergie par chacune des six souches : D-glucose, D-fructose, D-ribose, D-mannitol, D-sorbitol, D-arabitol, L-arabitol, glycérol, méthanol, éthanol, propanol, formiate, acétate, propionate, butyrate, malonate, succinate, glycolate, L-lactate, D-lactate, pyruvate, sarcosine, α -L-alanine, β -alanine, asparagine, L-proline et 4-amino-*n*-butyrate.

Les 63 substrats suivants ne sont utilisés par aucune des six souches : L-glucose, D-fucose, L-fucose, β -méthyl-D-glucoside, α -méthyl-D-galactoside, β -méthyl-D-galactoside, α -méthyl-D-mannoside, salicine, D-saccharate, α -méthyl-D-xyloside, β -méthyl-D-xyloside, D-érythrose, lactose, cellobiose, mélébiose, arbutine, raffinose, amidon, inuline, *méso*-érythritol, 2-phényl-éthanol, caprate, oxalate, citrate, DL-isocitrate, tartronate, β -hydroxy- β -méthylglutarate, *l*-tartrate, mucate, maléate, *trans*-aconitate, *cis*-aconitate, *ortho*-hydroxybenzoate, phtalate, L-mandélate, D-mandélate, téréphtalate, nicotinate, cinnamate, *para*-aminobenzoate, phénylacétate, benzoylformate, naphthalène, testostérone, dodécane, hexadécane, glycine, DL-thréonine, DL-méthionine, L-arginine, DL-ornithine, L-citrulline, histamine, L-tryptophane, D-tryptophane, acétamide, tryptamine, benzyamine, DL-2-amino-*n*-butyrate, putrescine, spermine, géranol et poly- β -hydroxybutyrate (extrait et purifié à partir de *Bacillus megaterium*).

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

Nous avons ajouté 0,05 % de bicarbonate de sodium aux cultures sur méthanol afin de réduire la phase de latence [3]. La croissance de la souche 5 est représentée sur la figure 1 en coordonnées semi-logarithmiques.

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

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
D-galactose	2	1, 3, 5, 6
L-sorbose	1	1, 2, 3, 4, 5
D-mannose	4	1, 4
D-glucosamine	2	1, 3, 5, 6
α -méthyl-D-glucoside	5	2
D-gluconate	5	2
D-glucuronate	2	1, 2, 3, 4
D-xylose	3	1, 3, 4
D-arabinose	1	1, 2, 3, 4, 5
L-arabinose	3	3, 5, 6
L-rhamnose	2	1, 3, 4, 5
Inosine	1	1, 3, 4, 5, 6
Maltose	5	2
Saccharose	5	2
Tréhalose	5	2
D-mélézitose	5	2
2-céto-D-gluconate	5	3
D-dulcitol	2	2, 3, 5, 6
Ribitol	5	3
Glycérate	5	3
1,2-propanediol	5	3
2,3-butanediol	5	3
1,2-éthanediol	5	3
Butanol	1	1, 3, 4, 5, 6
Isobutanol	3	3, 4, 6
Isobutyrate	5	3
Valérate	3	1, 2, 4
Isovalérate	2	1, 2, 3, 4
Caproate	1	1, 2, 3, 4, 6
Pélarionate	1	1, 2, 3, 4, 5
Glutarate	5	4
Adipate	1	1, 3, 4, 5, 6
Pimélate	1	1, 3, 4, 5, 6
Subérate	1	1, 3, 4, 5, 6
Sébacate	1	1, 3, 4, 5, 6
L-malate	5	3
D-malate	3	2, 3, 4
DL-3-hydroxybutyrate	5	3
<i>d</i> -tartrate	2	1, 2, 3, 4
<i>méso</i> -tartrate	2	1, 2, 3, 4
Azélaïdate	1	1, 3, 4, 5, 6
α -cétoglutarate	4	1, 3
Lévulinate	2	1, 2, 3, 4
Fumarate	5	3
Itaconate	2	2, 3, 5, 6
Mésaconate	2	2, 3, 5, 6
Citraconate	2	2, 3, 4, 6
Crotonate	4	2, 4
Benzoate	2	1, 2, 3, 4
<i>para</i> -hydroxybenzoate	4	2, 3
<i>méta</i> -hydroxybenzoate	2	2, 3, 5, 6
Quinate	3	1, 2, 4
Hippurate	4	2, 3
Anthranilate	2	1, 3, 4, 5
Kynurénate	2	1, 2, 3, 4
<i>d</i> -pantothénate	2	1, 2, 3, 4
Créatine	5	2
Bétaïne	5	6
α -D-alanine	2	1, 2, 3, 6
DL-valine	1	1, 2, 3, 5, 6
DL- <i>nor</i> -valine	1	1, 2, 3, 5, 6
L-leucine	5	3
L- <i>nor</i> -leucine	2	2, 3, 4, 5

TABLEAU I (suite)

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
L-isoleucine	5	3
DL-sérine	3	1, 2, 3
DL-aspartate	1	1, 2, 3, 4, 5
L-glutamate	4	5, 6
L-lysine	1	1, 2, 3, 4, 5
L-histidine	2	1, 2, 3, 4
L-phénylalanine	1	1, 2, 3, 4, 6
L-tyrosine	3	3, 5, 6
Ethanolamine	1	1, 2, 4, 5, 6
<i>n</i> -butylamine	2	3, 4, 5, 6
<i>n</i> -amylamine	2	3, 4, 5, 6
Méthylamine	3	3, 5, 6

Trois expériences distinctes ont été faites avec chaque substrat. Voici les valeurs des temps de génération moyens à 37° : acétate, 1,48 h ; éthanol, 2,30 h ; formiate, 3 h ; méthanol, 6,32 h. Rappelons que la souche 5 ne croît pas sur monométhylamine.

La souche 2 se différencie des cinq autres souches par son incapacité de croître aux dépens de l' α -méthyl-D-glucoside, du D-gluconate, du maltose, du saccharose, du tréhalose, du D-mélézitose et de la créatine, ainsi que par son aptitude à croître aux dépens de l'inosine, du butanol, de l'adipate, du pimélate, du subérate, du sébacate et de l'azélaïdate. En outre elle ne dégrade aucun des composés aromatiques suivants : *para*-hydroxybenzoate, *mé*ta-hydroxybenzoate et quinate.

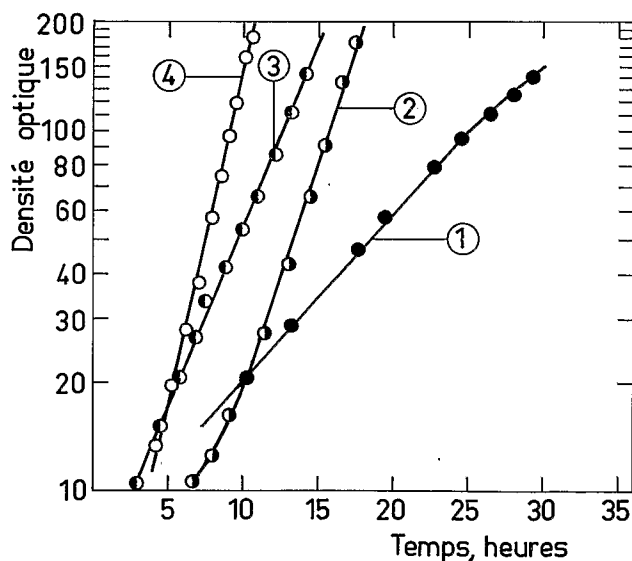


FIG. 1. — Croissance de la souche 5 aux dépens de divers aliments carbonés : (1) méthanol, (2) éthanol, (3) formiate, (4) acétate.

II. — *Caractères biochimiques et physiologiques*

Les six souches sont prototrophes, croissent en eau peptonée à pH 9 et en bouillon contenant 6 % de NaCl. Elles accumulent du poly- β -hydroxybutyrate mais n'hydrolysent pas ce composé lorsqu'il est présent dans le milieu de culture. Elles assimilent NO_3^- et croissent, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . Ces composés sont dénitrifiés avec production de gaz. Elles synthétisent la nitrate-réductase A [15] et la nitrite-réductase respiratoire [13], en anaérobiose et en présence de NO_3^- . Elles croissent, en anaérobiose, en milieu minimal contenant du formiate et NO_3^- . Il en résulte une accumulation importante de nitrite. La souche 2 croît faiblement sur formiate, en aérobiose aussi bien qu'en anaérobiose. Les six souches sont incapables de croître aux dépens du méthanol, en anaérobiose et en présence de NO_3^- .

Les six souches donnent une réponse franchement positive au test à l'oxydase et synthétisent la catalase et un cytochrome de type *c*. Elles ne croissent pas à 4°, ne réduisent pas le tétrathionate, ne possèdent pas l'arginine-dihydrolase constitutive, n'hydrolysent pas la gélatine, l'amidon et le Tween 80. Les souches 1, 3, 4, 5 et 6 croissent en milieu minéral sous des atmosphères contenant H_2 , O_2 et CO_2 ou bien H_2 , N_2O et CO_2 .

Seules les souches 2, 5 et 6 croissent à 40°. La nitrate-réductase B [15] n'est synthétisée que par les souches 1 et 4. L'uréase est présente chez les souches 5 et 6 ; elle est absente chez les souches 1, 2, 3 et 4. Les souches 5 et 6 réalisent un clivage *ortho* du catéchol au cours de la dégradation du benzoate. Les souches 1 et 4 réalisent un clivage *ortho* du protocatéchuate au cours de la dégradation du *para*-hydroxybenzoate. La souche 3 réalise un clivage *ortho* du protocatéchuate au cours de la dégradation du quinate. Le clivage *méta* des diphénols est absent. Les souches 1, 3, 4, 5 et 6 ont une hydrogénase et la L-phénylalanine-désaminase. La souche 2 ne possède pas ces deux enzymes.

III. — *Dénitrification*

La dénitrification a été étudiée quantitativement, à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse [14], avec des suspensions cellulaires non proliférantes de la souche 5. Les cellules issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- , réduisent NO_3^- en N_2 , NO_2^- en N_2O et N_2 , N_2O en N_2 , et NO en N_2O et N_2 . L'oxyde nitreux est également produit à partir de NO_3^- mais il est rapidement réduit en N_2 . Les cellules issues de cultures anaérobies sous N_2O réduisent NO_3^- en N_2 , NO_2^- en N_2O et N_2 , N_2O en N_2 , et NO en N_2O et N_2 . L'activité oxyde nitreux-réductase des deux suspensions est élevée.

IV. — *Génotype*

Les teneurs en guanine + cytosine de l'ADN, exprimées en pour-cent des bases totales, ont les valeurs suivantes : souche 1 = 66,3 ; 2 = 63,3 ;

3 = 67,3 ; 4 = 66,3 ; 5 = 67 ; 6 = 67. La moyenne de ces six valeurs est de $66,2 \pm 1,5$. Par contre la moyenne est de $66,8 \pm 0,45$ si l'on écarte la valeur exceptionnellement faible du G + C % de la souche 2.

DISCUSSION

Les deux souches de *P. denitrificans* étudiées par Davis et coll. [4] sont capables de croître, en aérobiose, aux dépens de H_2 comme source d'énergie et de CO_2 comme source de carbone. Dans ces conditions le cycle de Calvin intervient dans la biosynthèse des constituants cellulaires [9]. Seule la souche 2, qui n'a pas d'hydrogénase, se montre incapable de croître dans les conditions chimiolithotropes.

Les cultures d'enrichissement réalisées par Koster [8, 19] avaient été faites en milieu minéral contenant KNO_3 , ensemencé avec de la terre de jardin, placé sous une atmosphère contenant 15 % de CO_2 et 85 % de H_2 et mis en incubation à 32°. Bien qu'une réduction importante de la pression du gaz s'établisse rapidement, aucune croissance ne se produit après repiquage dans un milieu neuf. Celle-ci devient cependant possible si l'on ajoute de l'extrait de levure. Selon Verhoeven et coll. [19] on pourrait se trouver en présence d'un cas de chimio-métatrophie : l'énergie provient d'une conversion minérale, tandis que des facteurs de croissance sont indispensables à la prolifération de l'organisme [10]. Mais il paraît peu probable qu'une bactérie, prototrophe dans les conditions de vie chimio-organotrophes, devienne auxotrophe dans les conditions de vie chimio-lithotropes. Bovell [2] a émis l'hypothèse suivant laquelle *P. denitrificans* serait incapable de croître dans les conditions chimio-lithotropes aux dépens de H_2 comme source d'énergie et de NO_3^- comme oxydant, en raison de l'inactivation de l'hydrogénase provoquée par le nitrite qui s'accumule dans le milieu. En allégeant cette inhibition, l'extrait de levure permettrait la croissance. L'hypothèse ci-dessus est confirmée par le fait que les souches pourvues d'une hydrogénase croissent en milieu minéral aux dépens de H_2 comme source d'énergie et de N_2O comme substrat respiratoire.

P. denitrificans est une bactérie méthylo-trophe facultative qui croît aux dépens du méthanol en aérobiose et du formiate en aérobiose ou en anaérobiose. Beaucoup de microorganismes capables d'assimiler les composés comportant un seul atome de carbone ont été isolés ces dernières années [7, 16]. Verhoeven et coll. [19] avaient déjà découvert l'utilisation du formiate comme donneur d'électrons dans la dénitrification chez *P. denitrificans*. Cox et Quayle [3] avaient déjà signalé la croissance aérobie aux dépens du méthanol, du formiate et de la monométhylamine.

On notera que les six souches examinées se différencient de la souche type 381 [5] par leur aptitude à utiliser le D-ribose et la β -alanine.

La teneur en G + C de l'ADN est comprise entre 66,3 et 67,3 % chez cinq des six souches. Par contre, elle est nettement plus faible chez la souche 2 qui se différencie des autres par 17 caractères distincts et qui

pourrait être éventuellement considérée comme une espèce différente.

Le présent travail confirme et complète les observations du groupe de Berkeley [4, 5, 6].

RÉSUMÉ

Quatre des six souches étudiées proviennent d'une collection ; les deux autres ont été isolées du sol par culture d'enrichissement. Le métabolisme de *Paracoccus denitrificans* est respiratoire ; le nitrate, le nitrite, l'oxyde nitreux et l'oxygène sont utilisés comme accepteurs d'électrons. L'organisme donne une réaction positive au test à l'oxydase et possède un cytochrome *c* et une catalase. Il n'exige aucun facteur de croissance. En aérobiose, les six souches utilisent les 27 composés suivants comme sources de carbone et d'énergie : D-glucose, D-fructose, D-ribose, D-mannitol, D-sorbitol, D-arabitol, L-arabitol, glycérol, méthanol, éthanol, *n*-propanol, formiate, acétate, propionate, butyrate, malonate, succinate, glycolate, L-lactate, D-lactate, pyruvate, sarcosine, α -L-alanine, β -alanine, asparagine, L-proline et γ -aminobutyrate.

Cinq des six souches sont capables de croître en milieu minéral sous une atmosphère contenant H₂, N₂O (ou O₂) et CO₂. Elles sont par conséquent chimio-organotrophes, méthylotrophes et chimio-lithotrophes. Elles synthétisent du poly- β -hydroxybutyrate et n'hydrolysent pas la gélatine ni le Tween 80. Le nitrate est utilisé comme source d'azote. La nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. L'amylase, la tétrathionate-réductase et l'arginine-dihydrolase constitutive sont absentes. Cinq des six souches possèdent l'hydrogénase et la L-phénylalanine-désaminase. La dégradation des composés aromatiques s'effectue par un clivage *ortho* du catéchol ou du protocatéchuate.

L'ADN de cinq des six souches a une teneur en G + C comprise entre 66,3 et 67,3 %. Une souche à une teneur en G + C de 63,3 % et diffère nettement des autres par 17 caractères distincts.

MOTS-CLÉS : *Paracoccus denitrificans*, Sol, Nutrition bactérienne, Dénitrification, Taxonomie.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur vive reconnaissance au Dr H. G. Schlegel (Institut für Mikrobiologie der Universität, Göttingen, République Fédérale Allemande) pour le concours précieux qu'il leur a apporté lors de l'étude de la croissance dans les conditions chimiolithotrophes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEIJERINCK, M. W. & von MINKMAN, D. C. J., Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zbl. Bakt.*, II. Abt., Orig., 1910, 25, 30-63.

- [2] BOVELL, C., The effect of sodium nitrite on the growth of *Micrococcus denitrificans*. *Arch. Mikrobiol.*, 1967, 59, 13-19.
- [3] COX, R. B. & QUAYLE, J. R., The autotrophic growth of *Micrococcus denitrificans* on methanol. *Biochem. J.*, 1975, 150, 569-571.
- [4] DAVIS, D. H., DOUDOROFF, M. & STANIER, R. Y., Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int. J. syst. Bact.*, 1969, 19, 375-390.
- [5] DAVIS, D. H., STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. & MANDEL, M., Taxonomic studies on some Gram negative polarly flagellated « hydrogen bacteria » and related species. *Arch. Mikrobiol.*, 1970, 70, 1-13.
- [6] DOUDOROFF, M., Genus *Paracoccus* Davis in Davis, Doudoroff, Stanier and Mandel 1969, 384, in « Bergey's manual of determinative bacteriology », 8^e édition (R. E. Buchanan & N. E. Gibbons) (p. 438-440), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [7] HARDER, W., Microbial metabolism of organic C1 and C2 compounds. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1973, 39, 650-652.
- [8] KLUYVER, A. J., Some aspects of nitrate reduction, in « Symposium microbial metabolism » (p. 71-91), Istituto Superiore di Sanità, Rome, 1953.
- [9] KORNBERG, H. L., COLLINS, J. F. & BIGLEY, D., The influence of growth substrates on metabolic pathways in *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 1960, 39, 9-24.
- [10] LWOFF, A., Système de la nutrition et classification physiologique, in « L'évolution physiologique » (J. Bordet) (p. 64-70), Hermann, Paris, 1943.
- [11] MANDEL, M., Deoxyribonucleic acid base composition in the genus *Pseudomonas*. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 273-292.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [16] QUAYLE, J. R., The metabolism of one-carbon compounds by micro-organisms, in « Advances in microbial physiology » (A. H. Rose & D. W. Tempest), 7 (p. 119-203), Academic Press, New York, 1972.
- [17] 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.
- [18] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271.
- [19] VERHOEVEN, W., KOSTER, A. L. & van NIEVELT, M. C. A., Studies on true dissimilatory nitrate reduction. — III. *Micrococcus denitrificans* Beijerinck, a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1954, 20, 273-284.