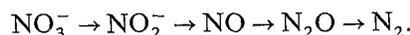


MICROBIOLOGIE. — *Isolement de bactéries utilisant en anaérobiose l'oxyde nitrique comme accepteur d'électrons respiratoire.* Note (\*) de **Francis Pichinoty, Jean-Louis Garcia, Manley Mandel, Claudette Job et Michel Durand**, transmise par M. Roger Buvat.

Dix bactéries appartenant au genre *Bacillus* ont été isolées à partir de sols pasteurisés, en anaérobiose et à 32°C, en bouillon peptoné contenant 0,5 % de  $\text{KNO}_2$ . Elles ont l'aspect de bâtonnets à Gram variable produisant des spores ovales. Elles sont oxydase-positives, ont une catalase et croissent, en anaérobiose, en présence de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{NO}$  comme accepteurs d'électrons respiratoires. Ces composés sont réduits en  $\text{N}_2$ .

*Ten bacteria of the genus Bacillus were isolated from pasteurized soils, in anaerobiosis and at 32°C, on peptone broth containing 0.5%  $\text{KNO}_2$ . They are Gram variable rods producing oval spores. They are oxidase positive and have catalase. They grow, in anaerobiosis, on  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , and  $\text{NO}$  as respiratory electron acceptors. These compounds are reduced to  $\text{N}_2$ .*

Les oxydes nitrique et nitreux constituent vraisemblablement les deux avant-dernières étapes dans la dénitrification



La plupart des bactéries dénitrifiantes utilisent  $\text{N}_2\text{O}$  comme accepteur d'électrons respiratoire [(1), (2)]. Nous avons isolé des bactéries qui, dans certaines conditions de culture, tolèrent  $\text{NO}$ , réduisent ce gaz et croissent grâce à l'énergie ainsi libérée.

1. ISOLEMENT. — Les bactéries ont été isolées à partir de la terre, par culture d'enrichissement, en anaérobiose et à 32°C, dans le milieu suivant : bouillon nutritif, 8 g; extrait de levure, 5 g;  $\text{KNO}_2$ , 5 g; milieu minéral de base (3), 1 000 ml; pH 7. Les échantillons sont préalablement pasteurisés pendant 10 mn à 80°C afin d'éliminer les bactéries non sporulées.

2. MILIEUX. — La croissance en présence de  $\text{NO}$  a été étudiée à 32°C en ballons de 250 ml contenant 50 ml de l'un des deux milieux suivants : I. bouillon nutritif, 8 g; extrait de levure, 5 g; bacto-tryptone, 5 g; asparagine, 2 g (ou acétate de sodium, 4 g); milieu minéral de base (3), 1 000 ml; pH 8 (ajusté avec  $\text{NaOH}$  N); II. casaminoacides, 10 g; bacto-tryptone, 10 g; acétate de sodium, 5 g; biotine, 0,05 mg; acide folique, 0,1 mg; riboflavine, 5 mg; aneurine, 25 mg; acide nicotinique, 25 mg; pyridoxine, 25 mg; pantothénate, 25 mg; L-tryptophane, 100 mg; cystine, 10 mg; DL-thréonine, 100 mg; milieu minéral de base (3), 1 000 ml; pH 8 (ajusté avec  $\text{NaOH}$  N). L'atmosphère gazeuse contient 10 % de  $\text{NO}$  et 90 % de  $\text{N}_2$ . Il n'est pas nécessaire d'agiter les cultures. En anaérobiose et en l'absence de  $\text{NO}$ , le milieu I permet une légère croissance due vraisemblablement à la fermentation des hydrates de carbone présents dans l'extrait de levure. Le milieu II ne présente pas ce désavantage.

3. RÉDUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE. — Parmi les souches isolées nous en avons sélectionné dix qui sont capables de croître dans les milieux I et II en présence de  $\text{NO}$ . Le temps de génération et la croissance totale sont alors comparables à ceux observés en présence de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{N}_2\text{O}$ . Les gaz produits par les cultures de plusieurs souches ont été analysés par chromatographie (4). On observe l'apparition de  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$  au cours de la croissance, puis après plusieurs jours la disparition complète de  $\text{NO}$  et  $\text{N}_2\text{O}$  qui sont réduits en  $\text{N}_2$ . Il est probable qu'une partie de l'oxyde nitrique réagit avec les constituants organiques du milieu, mais sa réduction en  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$  est l'œuvre d'un processus biologique puisque ces deux

30 JUN 1978

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

Collection de Références

9302 Biol. Sol.

derniers gaz n'apparaissent pas dans des témoins non ensemencés. Les souches RS 1, RS 2, RS 3, RS 4, RS 5, RS 6 et RS 8 proviennent de sols de rizières du Sénégal; les souches SM 12, SM 13 et SM 14 ont été isolées à partir de sols de la région de Marseille.

L'examen microscopique montre que les cellules qui ont crû en présence de NO ont un aspect normal. Les souches mobiles conservent leur mobilité. Les bactéries sont demeurées viables puisqu'elles donnent naissance à des colonies sur l'agar nutritif.

Sous atmosphère d'hélium et en présence d'extrait de levure comme donneur d'électrons, les suspensions cellulaires de la souche RS 3 cultivée en anaérobiose et en présence de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$ , réduisent  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , NO et  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . La stœchiométrie des réactions est respectée puisqu'une mole de  $\text{N}_2$  est formée à partir d'une mole de  $\text{N}_2\text{O}$  et qu'approximativement deux moles de NO sont nécessaires à la production d'une mole de  $\text{N}_2$ .

4. MORPHOLOGIE ET CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES. — Les bactéries isolées se présentent sous la forme de bâtonnets à Gram variable, aux extrémités arrondies, ayant 0,4 à 0,6  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 2 à 8  $\mu\text{m}$  de longueur. Seule la souche RS 3 est immobile. Les autres souches sont mobiles par les moyens de flagelles péritriches. Elles présentent toutes des spores ovales et déformantes, ce qui les classe dans le second groupe morphologique du genre *Bacillus* [(<sup>5</sup>), (<sup>6</sup>), (<sup>7</sup>)]. Elles croissent en bouillon peptoné, en anaérobiose, en présence de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{N}_2\text{O}$ . Ces composés sont dénitrifiés avec production de  $\text{N}_2$ . Elles ont une catalase, sont oxydase-positives (<sup>8</sup>), synthétisent un cytochrome de type *c* et font fermenter le glucose et divers autres hydrates de carbone. Toutefois leur activité fermentaire est faible et se traduit, en anaérobiose, par une acidification légère du milieu de Hugh et Leifson (<sup>9</sup>). Ces bactéries sont auxotrophes et mésophiles. Elles constituent un ensemble phénotypiquement hétérogène et feront ultérieurement l'objet d'une description détaillée.

5. GÉNOTYPE. — La teneur en guanine + cytosine de l'ADN, calculée à partir de la densité de flottaison et exprimée en moles pour-cent, varie peu d'une souche à l'autre : RS 1, 40,8; RS 2, 40,3; RS 3, 39,8; RS 4, 39,8; RS 5, 41,3; RS 6, 40,8; RS 8, 41,5; SM 12, 42,9; SM 13, 42; SM 14, 42. La moyenne de ces valeurs est de  $41,1 \pm 1$ .

6. DISCUSSION. — Au cours du présent travail nous avons vérifié que de nombreuses bactéries dénitrifiantes appartenant aux genres *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. stutzeri*), *Alcaligenes* (*A. denitrificans* et *A. odorans*), *Paracoccus* (*P. denitrificans*), *Agrobacterium* et *Bacillus* (*B. licheniformis* et *B. azotoformans*), ne croissent pas en présence d'un mélange gazeux contenant 10 % de NO et 90 % de  $\text{N}_2$ , dans le milieu I même si celui-ci contient du nitrate ou du nitrite. L'oxyde nitrique est par conséquent toxique pour ces microorganismes. La croissance aux dépens de NO comme accepteur terminal d'électrons constitue donc un caractère spécifique des bactéries isolées. Aucune de nos expériences ne permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle ce gaz très réactif ne serait pas réduit directement par les microorganismes, mais serait converti en un autre oxyde de l'azote au contact des constituants organiques du milieu de culture. Toutefois les faits suivants rendent cette éventualité peu plausible : les bactéries dénitrifiantes étudiées jusqu'ici possèdent toutes une oxyde nitrique-réductase [(<sup>1</sup>), (<sup>2</sup>)]; la réduction de NO par les suspensions cellulaires de la souche RS 3 est rapide et ne comporte pas de phase de latence.

La réduction biologique de l'oxyde nitrique est susceptible de présenter un intérêt écologique, puisqu'une décomposition chimique du nitrite accompagnée d'une production de ce gaz a lieu dans divers sols acides, neutres ou alcalins (<sup>10</sup>).

- (\*) Séance du 27 février 1978.
- (<sup>1</sup>) W. J. PAYNE, *Bacteriol. Rev.*, 37, 1973, p. 409-452.
- (<sup>2</sup>) F. PICHINOTY, *Bull. Inst. Pasteur*, 71, 1973, p. 317-395.
- (<sup>3</sup>) F. PICHINOTY, M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 A, 1977, p. 75-87.
- (<sup>4</sup>) J.-L. GARCIA, *Soil Biol. Biochem.*, 6, 1974, p. 79-84.
- (<sup>5</sup>) R. E. GORDON, W. C. HAYNES et C. HOR-NAY PANG, *The genus Bacillus*, U. S. Department of Agriculture, 1973, Washington.
- (<sup>6</sup>) H. DE BARJAC et A. BONNEFOI, *Ann. Inst. Pasteur*, 122, 1972, p. 463-473.
- (<sup>7</sup>) T. GIBSON et R. E. GORDON, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1974, p. 541-542.
- (<sup>8</sup>) N. KOVACS, *Nature (London)*, 178, 1956, p. 703.
- (<sup>9</sup>) R. HUGH et E. LEIFSON, *J. Bacteriol.*, 66, 1953, p. 24-26.
- (<sup>10</sup>) L. A. BULLA, C. M. GILMOUR et W. B. BOLLEN, *Nature (London)*, 225, 1970, p. 664.

F. P. : *Laboratoire de Biochimie végétale,*  
*U.E.R. scientifique de Luminy, 13288 Marseille Cedex 2;*

J.-L. G. : *Laboratoire de Microbiologie, O.R.S.T.O.M., Dakar, Sénégal;*

M. M. : *The University of Texas,*  
*M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas, États-Unis;*

C. J. et M. D. : *Laboratoire de Biochimie végétale,*  
*U.E.R. scientifique de Luminy, 13288 Marseille Cedex 2.*