

Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*

F. PICHINOTY, M. DURAND ET C. JOB

Laboratoire de Biochimie Végétale, UER Scientifique de Luminy, Marseille, France

M. MANDEL

The University of Texas, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, TX, Etats-Unis

ET

J.-L. GARCIA

Laboratoire de Microbiologie, O.R.S.T.O.M., Dakar, Sénégal

Approuvé le 15 février 1978

PICHINOTY, F., M. DURAND, C. JOB, M. MANDEL et J.-L. GARCIA. 1978. Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*. Can. J. Microbiol. 24: 608-617.

Dix-sept souches de la nouvelle espèce *Bacillus azotoformans* ont été isolées par culture d'enrichissement en bouillon peptoné ensemencé avec de la terre pasteurisée, puis mis en incubation sous N_2O à 32°C. La bactérie est un bâtonnet à Gram-négatif, mobile par les moyens de flagelles péritriches et produisant des spores ovales dépourvues d'exosporium dans des sporanges renflés. Les cellules ont cependant une paroi épaisse, des mésosomes et un septum persistant, caractéristiques des bactéries à Gram-positif. La bactérie est dénuée d'activité fermentaire, n'attaque pas les hydrates de carbone, présente des exigences complexes en facteurs de croissance et ne croît, en anaérobiose, qu'en présence de l'un des accepteurs d'électrons suivants: NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $S_4O_6^{2-}$ et fumarate. Le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux sont dénitrifiés avec production de N_2 . Le microorganisme est mésophile, oxydase-positif, synthétise un cytochrome de type *c* et n'hydrolyse pas la gélatine, l'amidon ni le "Tween 80." Du poly- β -hydroxybutyrate est synthétisé lorsque la bactérie croît dans un milieu contenant du DL-3-hydroxybutyrate. Les enzymes suivantes sont présentes: nitrate-réductase A, nitrite-réductase respiratoire, tétrathionate- et fumarate-réductases, et L-glutaminate-déshydrogénase. Les enzymes suivantes sont absentes: thiosulfate-réductase, uréase, lécithinase, arginine-dihydrolase, phénylalanine-désaminase et catalase. La valeur moyenne du G + C pour-cent de l'ADN des 17 souches est de 39.8 ± 1.2 . Ces souches constituent un ensemble remarquablement homogène.

PICHINOTY, F., M. DURAND, C. JOB, M. MANDEL, and J.-L. GARCIA. 1978. Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*. Can. J. Microbiol. 24: 608-617.

Seventeen strains of the new species *Bacillus azotoformans* were isolated by enrichment culture in peptone broth inoculated with pasteurized soil and then incubated under N_2O at 32°C. The bacterium is a Gram-negative rod, motile with peritrichous flagella, which produces oval spores without exosporia in swollen sporangia. However, the cells have thick walls, mesosomes, and persistent septa characteristic of Gram-positive bacteria. The bacterium 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 , $S_4O_6^{2-}$, or fumarate. Nitrate, nitrite, and nitrous oxide are denitrified with the production of N_2 . The microorganism is mesophilic, gives a positive oxidase reaction, synthesizes a type *c* cytochrome, and does not hydrolyse gelatin, starch, or "Tween 80." Poly- β -hydroxybutyric acid is synthesized when the bacterium is grown in a medium containing DL-3-hydroxybutyrate. The following enzymes are present: nitrate reductase A, respiratory nitrite reductase, tetrathionate and fumarate reductases, and L-glutamate dehydrogenase. The following enzymes are absent: thiosulfate reductase, urease, lecithinase, arginine dihydrolase, phenylalanine deaminase, and catalase. For the 17 strains, the mean value of the G + C percent of the DNA is 39.8 ± 1.2 . All the strains are highly similar.

Introduction

Le présent travail avait été entrepris dans le but de déterminer s'il existe dans le sol des bactéries sporulées qui soient capables d'utiliser l'oxyde nitreux comme substrat respiratoire. En effet ce gaz, qui constitue l'avant-dernière étape dans la réduction de NO_3^- en N_2 , est utilisé comme accepteur d'électrons par la plupart des bactéries dénitrifiantes non sporulées (Payne 1973; Pichinoty 1973).

Des cultures d'enrichissement en milieu peptoné sous atmosphère de N_2O nous avaient permis d'isoler deux souches 1 et 2 présentant des propriétés presque identiques. Il est apparu clairement que nous avions affaire à une espèce non décrite pour laquelle l'épithète *Bacillus azotoformans* a été proposée (Pichinoty *et al.* 1976). Quinze nouvelles souches ont été isolées. Nous présentons ici une étude complète de ces bactéries.

6 AVR. 1979
O. R. S. T. O. M.
Collection de Référence
no 9574 Biol

Matériel et Méthodes

Souches de collection

Nous avons utilisé les souches 606, 948, 1137, 1138 et 1139 de *Bacillus brevis* (Waksman Institute of Microbiology, New Brunswick, Etats-Unis) et les souches 5122 et 5286 de *B. brevis* (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France). Les souches 46B5, 46E9 et 57E4 de *Bacillus nitritollens* proviennent également de la Collection de l'Institut Pasteur. Les souches 465 et 466 de *Bacillus thermodenitrificans* proviennent de la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen" (Göttingen, République Fédérale Allemande).

Isolement

Toutes les souches ont été isolées suivant la méthode précédemment décrite (Pichinoty *et al.* 1976).

Les souches 1, 2, 9, 15, 30, 32, 33 et 34 ont été isolées à partir de la terre de jardin. Les souches 35, 36 et 37 proviennent d'échantillons de sols prélevés dans la pinède de Luminy. Les souches 3, 14, 16, 18 et 19 ont été isolées à partir de terreaux. La souche 13 provient d'un échantillon de sol prélevé dans l'infrastructure d'un rocher de l'île de Riou près de Marseille.

Milieux

Le milieu de base contient tous les sels minéraux présents dans le milieu utilisé pour les cultures d'enrichissement à l'exclusion de la Bacto-peptone. Voici la composition des divers milieux employés: (I) bouillon nutritif, 8 g; KNO₃, 5 g; milieu de base, 1000 ml. (II) Extrait de levure, 4 g; milieu de base, 1000 ml. (III) Bouillon nutritif, 8 g; extrait de levure, 5 g; Bacto-tryptone, 5 g; L-asparagine, 2 g ou acétate de sodium, 4 g; milieu de base, 1000 ml; pH = 8 (ajusté par l'addition de NaOH N). (IV) Bacto-peptone, 10 g; KNO₃, 5 g (ou N₂O); milieu de base, 1000 ml.

Caractères morphologiques

Les mensurations des cellules et des spores ont été faites par examen microscopique à l'état frais. Les flagelles ont été mis en évidence par la technique de Rhodes (1958). Les capsules ont été recherchées en présence d'encre de chine. Le poly-β-hydroxybutyrate a été recherché par coloration au noir soudan des cellules cultivées en aérobiose dans le milieu II contenant 2% de DL-3-hydroxybutyrate. Les résultats ont été confirmés par extraction au chloroforme bouillant du lipide et conversion en acide crotonique (Law et Slepecky 1961).

Tests classiques

La température d'incubation était de 32°C. Les tests suivants ont été réalisés par les procédés décrits par Skerman (1967): liquéfaction de la gélatine, hydrolyse du "Tween 80," réaction de Voges-Proskauer et uréase. Les tests suivants ont été réalisés par les procédés décrits par Gordon *et al.* (1973): décomposition de la tyrosine, désamination de la phénylalanine, production d'indole et de dihydroxyacétone, hydrolyse de l'hippurate et de l'amidon, noircissement du glucose et de la tyrosine, réduction de NO₃⁻ en NO₂⁻, croissance en présence d'azoture, croissance à pH = 5.7, résistance au lysozyme, tolérance à l'égard de NaCl, réaction au jaune d'œuf et catalase. La production d'acide à partir des hydrates de carbone en aérobiose a été déterminée par la méthode de Hugh et Leifson (1953).

Attaque des acides organiques

Le milieu a la composition suivante: NaCl, 1 g; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; KH₂PO₄, 0.5 g; NH₄Cl, 0.5 g; extrait de levure, 1 g; agar, 15 g; acide organique, 2 g; rouge de phénol, 8 mg; eau distillée, 1000 ml; pH = 6.8 (ajusté par l'addition de KOH N). Ce milieu est utilisé sous forme de gélules inclinées qui sont ensemencées à l'anse avec un inoculum abondant. On ensemence aussi un témoin où l'acide organique est omis. On laisse en incubation à 32°C pendant 4 à 6 jours. Le test est considéré comme positif lorsque la coloration rosé est nettement

plus prononcée dans l'essai que dans le témoin. Seul le pyruvate de sodium est stérilisé par filtration.

Préparation des extraits enzymatiques

Les cellules sont récoltées et lavées par centrifugation. Après avoir été remises en suspension, elles sont soumises à un traitement sonique de 2 min. Les débris sont éliminés par centrifugation à 25 000 g pendant 10 min.

Activités enzymatiques

Les cultures anaérobies ont été réalisées sous vide en ballons de 3 l contenant 1 l de milieu. Les cultures aérobies ont été réalisées en fioles à toxine ou en erlenmeyers agités. Les cellules sont récoltées après 24 à 48 h d'incubation à 32°C. Les nitrate-réductases A et B (Pichinoty et Piéchaud 1968) et la nitrite-réductase respiratoire (Miyata et Mori 1968) ont été recherchées par des techniques manométriques dans les extraits préparés à partir de cellules cultivées en anaérobiose dans le milieu I. Les L-glutamate- et L-alanine-déshydrogénases ont été recherchées par une technique spectrophotométrique (Hong *et al.* 1959) dans les extraits préparés à partir de cellules cultivées en aérobiose dans le milieu II. On recherche aussi l'arginine-dihydrolase (Stanier *et al.* 1966) sur ces dernières cellules. La β-galactosidase a été recherchée (Hestrin *et al.* 1955) dans les extraits préparés à partir de cellules cultivées en aérobiose dans le milieu II contenant 0.4% de lactose. Les enzymes suivantes ont été recherchées dans les extraits préparés à partir de cellules cultivées en aérobiose dans le milieu II: catalase (Herbert 1955), superoxyde-dismutase (Elstner et Heupel 1976), malate-déshydrogénase (Goldman 1956b), isocitrate-déshydrogénase (Goldman 1956a), succinate-déshydrogénase (Bernath et Singer 1962), aconitase (Anfinsen 1955) et fumarase (Massey 1955).

Etude de la croissance en anaérobiose

On utilise des ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu II. Le vide est réalisé avec une pompe. Les accepteurs d'électrons sont employés aux concentrations suivantes: KNO₃, 0.5%; KNO₂, 0.05%; K₂S₄O₆, 0.2%; Na₂S₂O₃, 0.2%; fumarate de sodium, 0.2%. Le glucose est employé à la concentration de 0.5%. La croissance aux dépens de l'oxyde nitrique a été étudiée dans le milieu III. L'atmosphère gazeuse contient 10% de NO et 90% de N₂; les cultures sont agitées afin de permettre la diffusion de NO qui est peu soluble dans l'eau.

Spectres cytochromiques

Les cultures ont été faites dans le milieu II, soit en aérobiose, soit en anaérobiose en présence de KNO₃ à 0.5%. Les spectres cytochromiques différentiels ont été exécutés à la température de l'azote liquide avec un spectrophotomètre Cary 15 muni de cuves en plexiglass ayant un trajet optique de 3 mm. L'une des cuves contient les cellules additionnées d'hydrosulfite de sodium. La cuve témoin contient la même suspension additionnée de H₂O₂. Nous avons également effectué des spectres sur les cellules à la température ambiante en présence de CO. On ajoute dans ce cas de l'hydrosulfite dans les deux cuves en verre qui ont un trajet optique de 10 mm.

Composition en bases de l'ADN

La teneur en guanine + cytosine de l'ADN a été calculée à partir de la densité de flottaison (Mandel *et al.* 1968; Schildkraut *et al.* 1962).

Etude de la dénitrification

Les cultures ont été faites en anaérobiose dans le milieu IV. Les expériences ont été faites chaque fois en deux exemplaires dans des flacons sérum de 125 ml contenant suspension cellulaire, 1 ml; tampon phosphate, pH = 7, 18 mM; extrait de levure, 500 mg; KNO₃ ou KNO₂, 50 mg; krypton, 2 ml; eau, pour compléter le volume à 25 ml; phase gazeuse, hélium. Dans certaines expériences le nitrate et le nitrite sont remplacés par 10



FIG. 1. Cellules de la souche 1 colorées par la méthode de Gram. $\times 990$. Le trait noir correspond à $10 \mu\text{m}$.

ml de NO ou N_2O . Les flacons sont agités dans un bain à 37°C . On prélève 1 ml de gaz à la seringue toutes les 40 min pendant 6 h et l'on procède à son analyse par chromatographie en phase gazeuse (Garcia 1974; Pichinoty *et al.* 1977). Les activités spécifiques sont déduites de la pente des courbes représentant le dégagement ou la consommation de gaz. Elles sont exprimées en microlitres (22°C ; pression atmosphérique) par milligramme d'azote et par heure. L'azote des cellules a été dosé par micro-kjeldahl.

Résultats

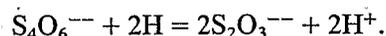
Morphologie

Les 15 nouvelles souches sont morphologiquement semblables aux souches 1 et 2 (Pichinoty *et al.* 1976). Rappelons que le Gram est négatif même sur des cellules en phase exponentielle de croissance (Fig. 1). Ces bâtonnets sont très mobiles, présentent une ciliation péritriche (Fig. 2) et ont un diamètre de $0.4 \mu\text{m}$. Sur les Figures 3 et 4 apparaissent divers détails intéressants: des fibrilles fines qui ne peuvent être identifiées plus précisément, des fragments de paroi monocouche et des fragments de paroi multicouche, des fragments de flagelles et un pili. Ces fragments sont apparus au cours de l'autolyse spontanée des cellules. Les spores sont elliptiques et nettement déformantes. Certaines souches sporulent plus facilement que d'autres. La Fig. 5 montre l'aspect d'une colonie.

Cultures

La croissance est rapide, dense et uniforme dans un milieu contenant les sels minéraux habituels et 0.4% d'extrait de levure. Il n'apparaît jamais de voile à la surface. Toutes les souches semblent présenter des exigences complexes en facteurs de croissance. Nous avons vu que les souches 1 et 2 ne se développaient pas, en aérobiose, dans le milieu minéral de base contenant 0.01% d'extrait de levure et un mélange de deux aliments carbonés (Pichinoty *et al.* 1976; Shen *et al.* 1959).

Dans les conditions anaérobies, les 17 souches ne croissent qu'en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$ ou de fumarate. Le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux sont réduits avec production de N_2 . La réduction du tétrathionate produit du thiosulfate que l'on peut doser par iodométrie; elle entraîne une acidification due à la libération de protons suivant la réaction:



Le thiosulfate n'est pas utilisé comme accepteur d'électrons. Neuf souches peuvent utiliser, en anaérobiose, le L-malate à la place du fumarate (Tableau 1). Aucune des 17 souches n'est capable de croître sous une atmosphère contenant 10% de NO et 90% de N_2 même si le milieu contient 0.5% de KNO_3 .

Aucune des 17 souches n'attaque oxydativement ou fermentativement les hydrates de carbone suivants: glucose, maltose, mannose, mannitol, L-sorbose, lactose, galactose, ribose, fructose et xylose. Au lieu d'une acidification, on observe en réalité une alcalinisation due vraisemblablement à la libération de NH_3 provoquée par la désamination oxydative des acides aminés présents dans le milieu. Aucune souche ne croît, en anaérobiose, dans le milieu II contenant 0.5% de glucose. Les souches 1 et 2 ne croissent pas, en anaérobiose, dans le milieu II contenant 0.5% de l'un des hydrates de carbone suivants: galactose, fructose, L-sorbose, D-arabinose, L-rhamnose, ribose, xylose, lactose, maltose et saccharose.

Caractères physiologiques

Le test classique à l'oxydase (Skerman 1967) donne un résultat faiblement positif lorsqu'il est appliqué aux colonies. Par contre la réaction devient franchement positive avec les extraits enzy-

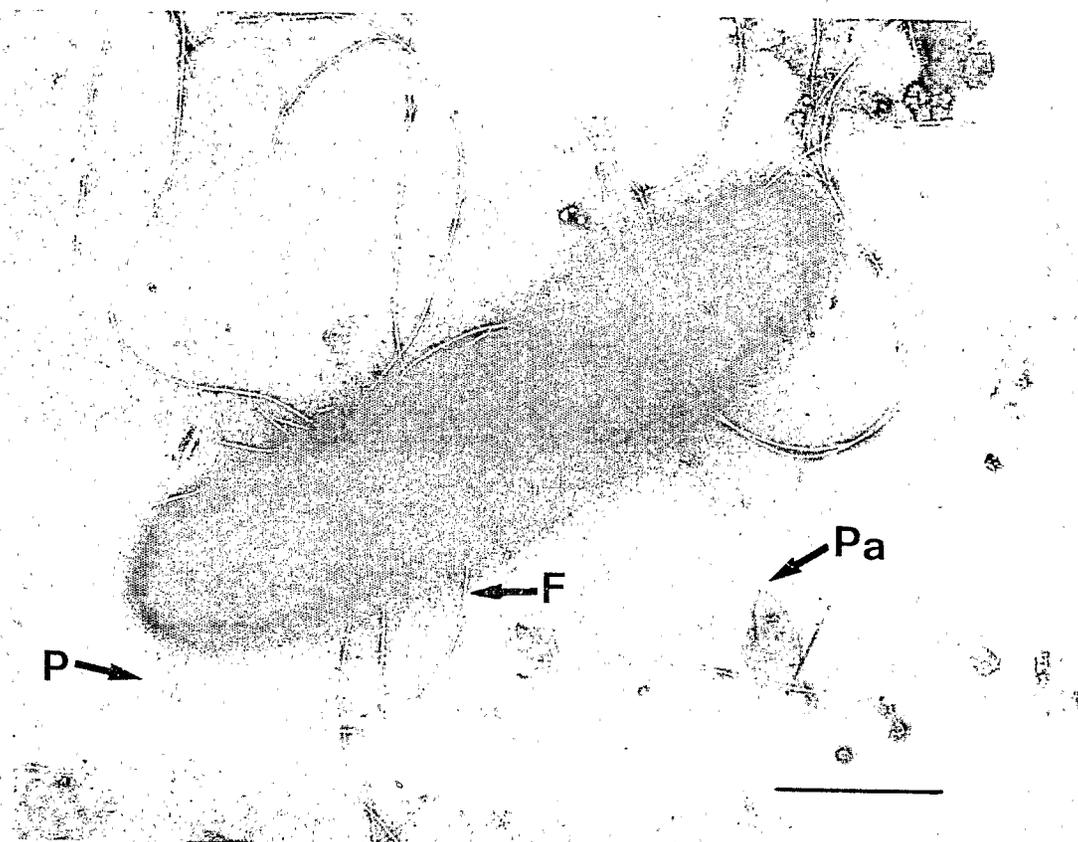


FIG. 2. Etude au microscope électronique de la souche 2. Coloration négative montrant les flagelles (F), un pilus (P) et un fragment de paroi (Pa). $\times 21\,300$. Le trait noir correspond à $1\ \mu\text{m}$.

matiques. Toutes les souches synthétisent un cytochrome de type *c* et possèdent les enzymes suivantes: nitrate-réductase A, nitrite-réductase respiratoire, tétrathionate- et fumarate-réductases, et L-glutamate-déshydrogénase. La superoxyde-dismutase a été trouvée chez les souches 1 et 2; elle n'a pas été recherchée chez les autres souches. La L-alanine-déshydrogénase est absente chez la plupart des souches (Tableau 1). L'addition de 0.2% de L-glutamate aux cultures ne provoque pas une répression de la biosynthèse de la L-glutamate-déshydrogénase chez les souches 1, 2, 3 et 34. L'addition de 0.2% de DL-alanine aux cultures de ces mêmes souches n'entraîne pas une induction de la biosynthèse de la L-alanine-déshydrogénase. Les enzymes suivantes sont absentes chez les 17 souches: thiosulfate-réductase, catalase, arginine-dihydrolase, L-phénylalanine-désaminase, uréase, lécithinase et β -galactosidase. Nous n'avons pas décelé la moindre activité catalasique dans les extraits enzymatiques des souches 1 et 2.

Les 17 souches ne produisent pas (ou produisent des quantités indosables) de poly- β -hydroxybuty-

rate lorsqu'elles croissent dans un milieu contenant 1% de Bacto-peptone ou 0.4% d'extrait de levure. Cependant l'addition de 0.2% de DL-3-hydroxybutyrate de sodium à ces milieux entraîne toujours une synthèse abondante du lipide. Les souches 1, 2, 9, 14 et 18 produisent aussi du poly- β -hydroxybutyrate lorsqu'elles croissent, en anaérobiose, dans le milieu II contenant 0.2% de DL-3-hydroxybutyrate de sodium et 0.5% de KNO_3 .

Les réactions suivantes sont constamment négatives: hydrolyse de la gélatine, de l'amidon et du "Tween 80"; croissance à $\text{pH} = 5.7$; croissance en présence de NaCl à 5%, de KNO_3 à 8%, de NaN_3 à 0.02% ou de lysozyme à 0.001%; réaction de Voges-Proskauer; production d'indole; décomposition de la tyrosine; production de pigment dans un milieu contenant du glucose ou de la tyrosine; décomposition de l'hippurate avec production d'acide benzoïque; conversion du glycérol en dihydroxyacétone.

Les températures maximales de croissance en bouillon peptoné sont comprises entre 42 et 46°C (Tableau 4).

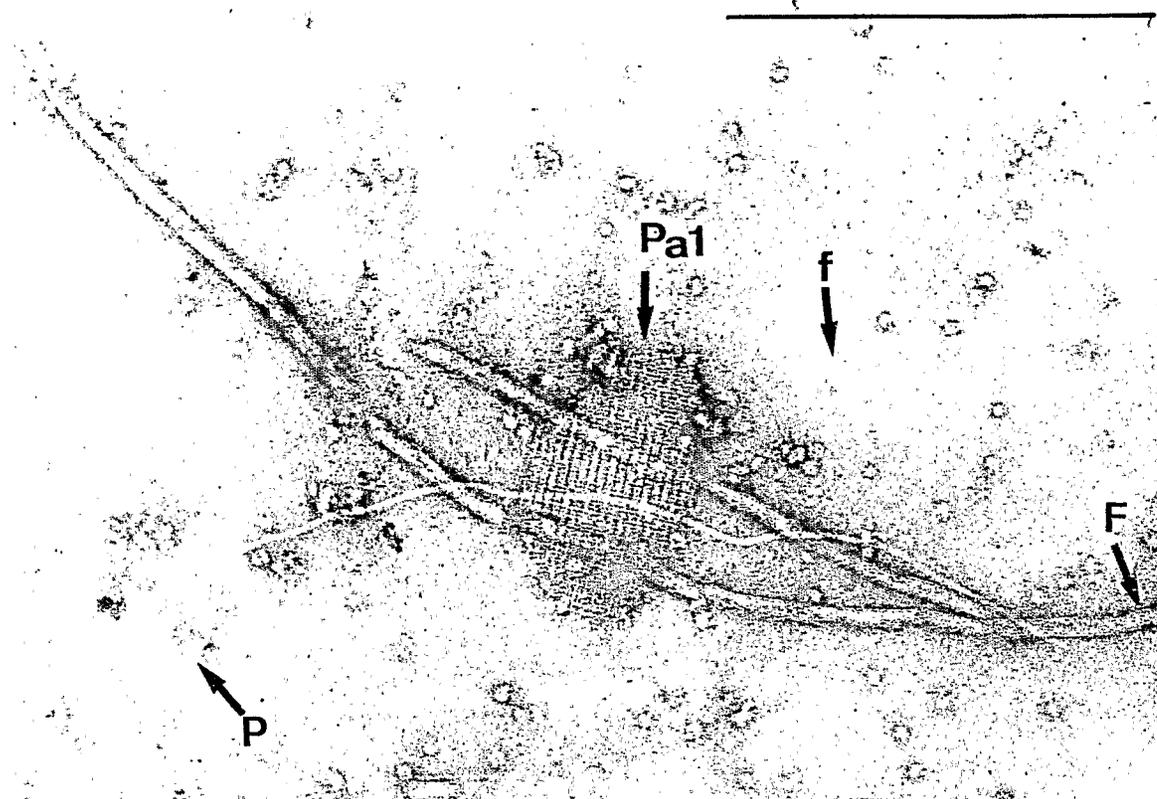


FIG. 3. Etude au microscope électronique de la souche 2. Coloration négative montrant les flagelles (F), un pilus (P), une fibrille (f) et un fragment de paroi monocouche (Pa1). $\times 113\ 000$. Le trait noir correspond à $0.5\ \mu\text{m}$.

Attaque des acides organiques

Les 17 souches attaquent l'acétate, le succinate, le DL-lactate, le pyruvate, le L-malate, le citrate, le L-glutamate, le L-aspartate et l'asparagine. Aucune d'elles n'attaque le propionate, le glycolate, le malonate, le glutarate, le tartrate et la glycine. Les acides organiques qui sont attaqués par une fraction des souches seulement figurent dans le Tableau 1.

Activité respiratoire des suspensions cellulaires

On utilise la technique manométrique de Warburg à 37°C . Chaque système contient substrat (diverticule), $20\ \mu\text{mol}$ (ou $8\ \text{mg}$ d'extrait de levure); tampon phosphate, $\text{pH} = 7$, $0.33\ \text{M}$, $1\ \text{ml}$; suspension cellulaire; eau, pour compléter le volume de la phase liquide à $3\ \text{ml}$; KOH à 20% (puits central), $0.1\ \text{ml}$. Les valeurs indiquées sont relatives puisqu'on attribue la valeur 100 à l'activité du système contenant l'extrait de levure. Nous avons utilisé la souche 1 et le milieu de culture II.

Les cellules ayant crû aux dépens de l'extrait de levure comme seule source de carbone et d'énergie

TABLEAU 1. Caractères variables

Caractère	No. de souches positives	Souches négatives
Croissance, en anaérobiose, en présence de L-malate	9	1, 3, 14, 16, 19, 9, 35, 37
L-Alanine-déshydrogénase	5	Toutes excepté 19, 33, 16, 35 et 37
Fumarate	16	9
α -Cétoglutarate	16	35
DL-3-Hydroxybutyrate	14	13, 32, 34
Butyrate	5	Toutes excepté 13, 15, 32, 36 et 37
Isobutyrate	11	2, 9, 14, 18, 33, 35
Valérate	10	2, 3, 9, 14, 30, 35, 36
Isovalérate	13	9, 18, 32, 35
L-Glutamine	9	1, 3, 9, 14, 18, 30, 36
L- α -Alanine	2	Toutes excepté 15 et 34

ont les activités suivantes: acétate, 110; L-glutamate, 96; succinate, 91; pyruvate, 86; L-malate, 76; fumarate, 65; citrate, 31; α -cétoglutarate, 0.

Les cellules ayant crû en présence de glucose ont

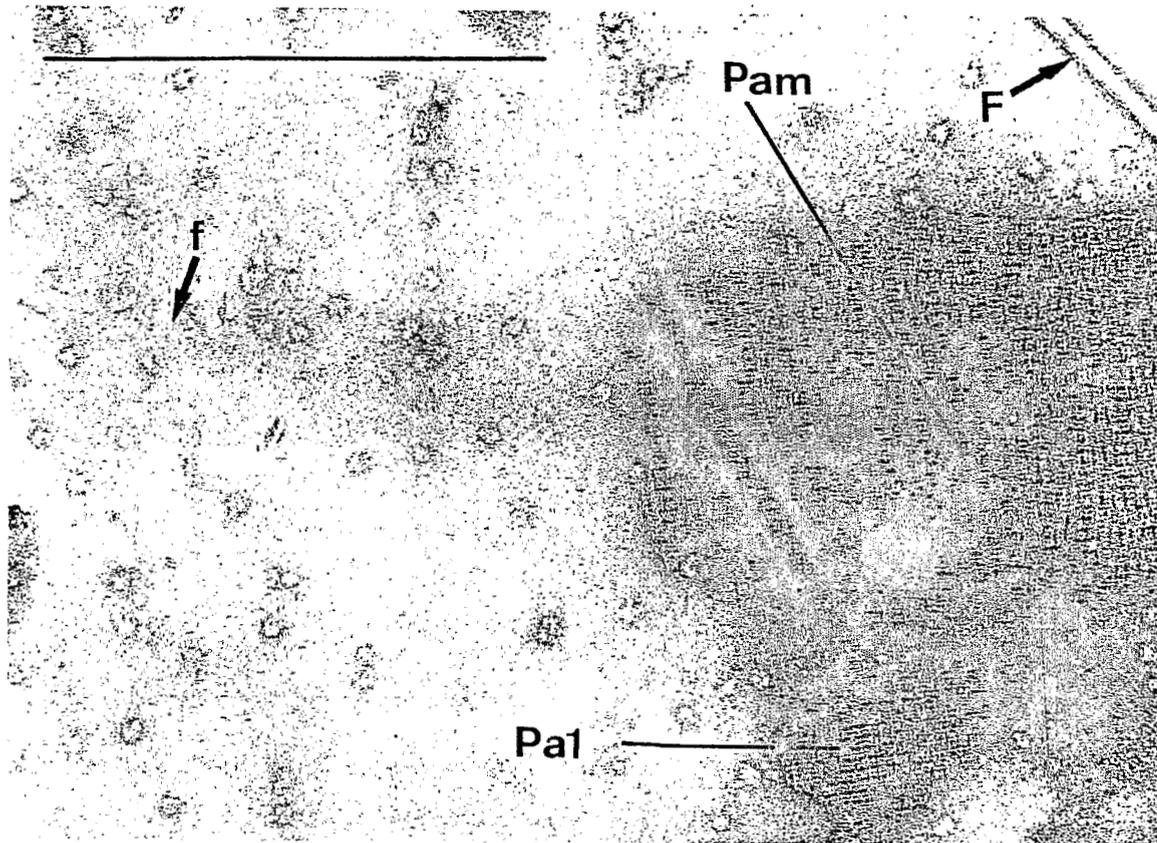


FIG. 4. Etude au microscope électronique de la souche 2. Coloration négative montrant des flagelles (F), une fibrille (f), des fragments de paroi monocouche (Pa1) et multicouche (Pam). $\times 130\ 000$. Le trait noir correspond à $0.5\ \mu\text{m}$.

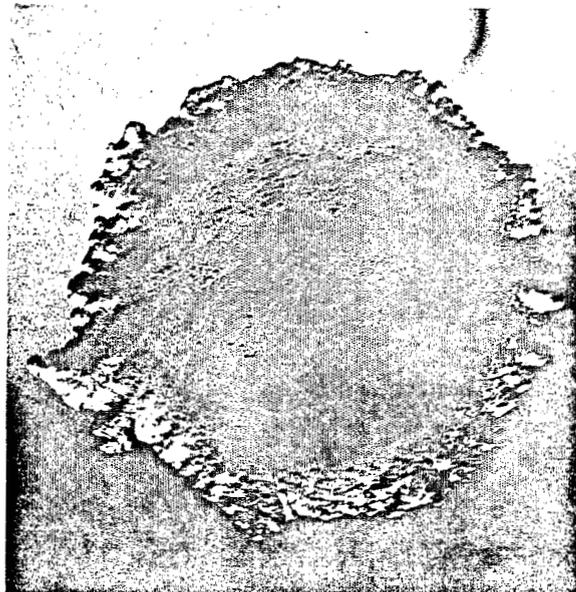


FIG. 5. Aspect sous éclairage oblique d'une colonie de la souche 2 sur agar nutritif. $\times 20$.

les activités suivantes: acétate, 94; L-glutamate, 48; succinate, 63; pyruvate, 49; L-malate, 30; fumarate, 53; citrate, 40; α -cétoglutarate, 13; glucose, 0.

Les cellules ayant crû en présence de DL-lactate ont les activités suivantes: acétate, 88; L-glutamate, 50; succinate, 25; pyruvate, 75; L-malate, 25; fumarate, 13; citrate, 13; α -cétoglutarate, 0; DL-lactate, 100; propionate, 0; DL-3-hydroxybutyrate, 38.

Recherche de quelques enzymes du cycle de Krebs

En aérobiose les souches 9, 18, 19 et 33 synthétisent les enzymes suivantes à un niveau élevé compatible avec un fonctionnement oxydatif du cycle de Krebs: succinate-déshydrogénase, fumarase, isocitrate-déshydrogénase, aconitase et L-malate-déshydrogénase.

Chaîne respiratoire

Nous avons examiné les souches 1, 2, 3, 9, 13, 32, 33, 34 et 35. Les différentes composantes cytochromiques de la chaîne respiratoire ont été identifiées sur des cellules cultivées en aérobiose.

TABLEAU 2. Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche 1

Accepteur d'électrons	Production, μl de gaz/mg N·h ⁻¹			Réduction, μl de gaz/mg N·h ⁻¹	
	NO	N ₂ O	N ₂	NO	N ₂ O
Culture anaérobie contenant NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	0	180	305	160
	NO ₂ ⁻	0	356	280	365
	NO		Faible	101	147
	N ₂ O			397	397
Culture anaérobie sous N ₂ O	NO ₃ ⁻	0	0	99	
	NO ₂ ⁻	52	4	99	
	NO		Faible	99	313
	N ₂ O			1990	1995

TABLEAU 3. Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche 2

Accepteur d'électrons	Production, μl de gaz/mg N·h ⁻¹			Réduction, μl de gaz/mg N·h ⁻¹	
	NO	N ₂ O	N ₂	NO	N ₂ O
Culture anaérobie contenant NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	0	32	26	0
	NO ₂ ⁻	6	61	0	0
	NO		95	56	209
	N ₂ O			5	7
Culture anaérobie sous N ₂ O	NO ₃ ⁻	0	63	48	
	NO ₂ ⁻	74	82	40	
	NO		81	59	289
	N ₂ O			732	737

La position des pics d'absorption des cytochromes *b*, *c* et *a* est indiquée à la température de l'azote liquide. Elle ne diffère pas sensiblement d'une souche à l'autre. Seule l'intensité des bandes varie. Deux oxydases sont présentes: *a* + *a*₃ dont le pic d'absorption dans le visible se situe à 600–602 nm, et le "carbon monoxide binding pigment" (ou cytochrome *o*) dont le pic d'absorption dans la région de Soret en présence de CO et à la température ambiante se trouve à 417–419 nm. Toutefois des doutes subsistent quant à l'identité réelle de ce cytochrome *o* car il n'a pas été caractérisé par son spectre d'action photochimique (Lemberg et Barrett 1973). On observe aussi la présence d'un cytochrome *c* dont le pic α se trouve à 547–548 nm, et d'un, de deux ou trois cytochromes *b* dont les pics α sont situés respectivement à 551–554 nm, 557–558 nm et 562–564 nm.

Des cellules cultivées en anaérobiose et en présence de NO₃⁻ ont également été examinées. Le cytochrome *c* et l'oxydase *o* sont toujours présen-

tes. Par contre l'oxydase *a* + *a*₃ est absente et les bandes d'un ou de deux cytochromes *b* deviennent invisibles chez quelques souches.

Etude de la dénitrification par les suspensions cellulaires

Nous avons choisi les souches 1 et 2. Les résultats figurent dans les Tableaux 2 et 3. Les suspensions cellulaires réduisent NO₃⁻ et NO₂⁻ en N₂ et (ou) N₂O. Elles réduisent aussi NO en N₂ et N₂O. L'oxyde nitreux est réduit quantitativement en N₂. Les bactéries cultivées en présence de N₂O ont une activité oxyde nitreux-réductase très élevée.

Génotype

Les teneurs en guanine + cytosine de l'ADN figurent dans le Tableau 4. La moyenne de ces 17 valeurs est de 39.8 ± 1.2.

Discussion

Les 17 souches étudiées constituent un ensemble remarquablement homogène. Elles représentent

TABLEAU 4. Températures maximales de croissance, teneurs de l'ADN en guanine + cytosine (G + C) exprimées en moles pour-cent et numéros d'inscription à la Collection de l'Institut Pasteur

Souche	Température maximale, °C	G + C	Numéros d'inscription
1	45	39	CIP R925
2	45	39.3	CIP 66-75
3	45	43.9	CIP R910
9	46	39.3	CIP R911
13	42	39.3	CIP R912
14	42	40.3	CIP R913
15	43	39.3	CIP R914
16	46	41	CIP R915
18	43	39.8	CIP R916
19	46	39.3	CIP R917
30	46	38.8	CIP R918
32	44	39.8	CIP R919
33	45	38.8	CIP R920
34	46	39.8	CIP R923
35	46	39.8	CIP R921
36	46	38.8	CIP R924
37	45	39.8	CIP R922

une espèce étroite au sens de Stanier (1976) appartenant au second groupe morphologique du genre *Bacillus* (de Barjac et Bonnefoi 1972; Gibson et Gordon 1974; Gordon *et al.* 1973; Smith *et al.* 1952). Elles ont en commun avec *B. brevis* deux caractères importants: l'absence de pouvoir fermentaire et la réponse positive au test à l'oxydase. Cependant nous avons établi que les souches 5122 et 5286 de *B. brevis* ne croissent pas, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$ ou de fumarate, qu'elles liquéfient la gélatine, qu'elles produisent une catalase, une arginine-dihydrolase et une lécithinase (de Barjac et Bonnefoi 1972), qu'elles n'ont pas la L-glutamate-déshydrogénase. Des plus les valeurs des G + C% des souches 5122 et 5286 sont respectivement de 44.9 et 48. Enfin les souches 606, 948, 1137, 1138 et 1139 de *B. brevis*, qui produisent une légère dénitrification en tubes (Smith *et al.* 1952), sont incapables de croître, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O .

Les souches 46B5, 46E9 et 57E4 de *B. nitritolens*, 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 (Delaporte 1972). Les valeurs des G + C% des souches 46B5 et 46E9 sont respectivement de 37.8 et 41.8.

Bacillus thermodenitrificans est une bactérie thermophile, à Gram-négatif, produisant des spores

ovales et déformantes (Ambroz 1913; Klaushofer et Hollaus 1970; Wolf et Barker 1968). Nous avons examiné les souches 465 et 466. Les cultures ont été faites, à 50°C, dans un milieu contenant 1% de Bacto-peptone et 1% d'extrait de levure. On n'observe aucune croissance à 32°C. 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; alors que la souche 466 ne réduit pas NO_3^- en NO_2^- et fait fermenter le glucose. Les valeurs des G + C% des souches 465 et 466 sont respectivement de 52 et 40.8. Elles ne représentent donc pas la même espèce.

Il semble donc bien que l'on doive considérer la bactérie décrite comme une nouvelle espèce pour laquelle nous avons proposé dans une note antérieure (Pichinoty *et al.* 1976) le nom de *Bacillus azotoformans* n. sp. L'épithète *B. denitrificans* un moment envisagée a dû être abandonnée car elle avait déjà été employée en 1891 (Giltay et Abersson 1891) pour désigner une bactérie dénitrifiante qui était sans doute une pseudomonade.

Comme la plupart des espèces du sous-groupe II (Knight et Proom 1950), *B. azotoformans* exige des facteurs de croissance. Par contre la production de poly- β -hydroxybutyrate n'avait jamais été observée chez une bactérie appartenant à ce sous-groupe. Les souches 5122 et 5286 de *B. brevis* ne synthétisent pas ce lipide lorsqu'elles croissent dans un milieu contenant du DL-3-hydroxybutyrate.

On remarquera l'absence de catalase, 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 (Gordon *et al.* 1973).

Bacillus azotoformans est la seule bactérie connue qui soit capable d'utiliser les six accepteurs d'électrons respiratoires suivants: O_2 , NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{--}$ et fumarate. Deux espèces anaérobies strictes récemment découvertes: *Desulfuromonas acetoxidans* (Pfennig et Biebl 1976) et *Desulfotomaculum acetoxidans* (Widdel et Pfennig 1977), peuvent utiliser comme accepteur d'électrons le fumarate à la place du soufre et du sulfate respectivement.

Le métabolisme énergétique de *B. azotoformans* repose essentiellement sur le cycle de Krebs. La fonction de la L-glutamate-déshydrogénase est sans doute la conversion du L-glutamate en α -cétoglutarate, puisque sa biosynthèse n'est pas réprimée par cet acide aminé. Les substrats utilisés comme sources d'énergie sont, soit des membres du cycle

de Krebs, soit des composés convertibles en l'un d'entre eux.

La seule bactérie dénitrifiante, sporulée, méso-ophile, connue est *B. licheniformis* qui est à Gram positif et qui produit des spores non déformantes (Beijerinck et von Minkman 1910; Gibson et Gordon 1974; Gordon *et al.* 1973; Lemille *et al.* 1969; Smith *et al.* 1952; Verhoeven 1952), ce qui classe cette espèce dans le premier groupe morphologique du genre *Bacillus*. Toutefois il a été établi récemment que cette bactérie que ne possède ni la nitrite-réductase respiratoire ni l'oxyde nitreux-réductase est incapable de croître en anaérobiose en présence de NO_2^- ou N_2O (Pichinoty *et al.* 1978).

La souche 1 sera considérée comme l'holotype de *B. azotoformans*. Les souches ont été déposées à la Collection de l'Institut Pasteur de Paris (Tableau 4).

Remerciements

Nous exprimons notre reconnaissance au Dr. R. E. Gordon (Waksman Institute of Microbiology, New Brunswick, Etats-Unis) pour l'intérêt qu'elle a manifesté pour le présent travail. Nous remercions vivement le Dr. F. Mayer (Institut für Mikrobiologie der Universität, Göttingen, République Fédérale Allemande) et le Dr. A. Ryter (Institut Pasteur, Paris, France), qui ont réalisé et interprété les prises de vue au microscope électronique. Nous remercions également le Dr. A. Kurkdjian (Laboratoire de Physiologie Végétale et Physiologie Végétale Appliquée, Université de Paris VI, France), qui a photographié les colonies. L'aide apportée par le Dr. P. Vignais (Laboratoire de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, France) pour la réalisation des spectres cytochromiques a été grandement appréciée.

- AMBROZ, A. 1913. *Denitrobacterium thermophilum* spec. nova, ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. Cent. Bakt. Abt. II, 37: 3-16.
- ANFENSEN, C. B. 1955. Aconitase from pig heart muscle. *Dans* Methods in enzymology. Vol. I. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 695.
- BEIJERINCK, M. W., et D. C. J. VON MINKMAN. 1910. Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Cent. Bakt. Abt. II, 25: 30-63.
- BERNATH, P., et T. P. SINGER. 1962. Succinic dehydrogenase. *Dans* Methods in enzymology. Vol. 5. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 597.
- DE BARIAC, H., et A. BONNEFOI. 1972. Essai de classification biochimique de 64 "*Bacillus*" des groupes II et III représentant II espèces différentes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 122: 463-473.
- DELAPORTE, B. 1972. Trois nouvelles espèces de "*Bacillus*":

- "*Bacillus similibadius*" n. sp., "*Bacillus longisporus*" n. sp. et "*Bacillus nitritollens*" n. sp. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 123: 821-834.
- ELSTNER, E. F., et A. HEUPEL. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride: a simple assay for superoxide dismutase. Anal. Biochem. 70: 616-620.
- GARCIA, J.-L. 1974. Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. Soil Biol. Biochem. 6: 79-84.
- GIBSON, T., et R. E. GORDON. 1974. *Genus I. Bacillus*. *Dans* Bergey's Manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 541.
- GILTAY, E., et J. H. ABERSON. 1891. Recherches sur un mode de dénitrification et sur le schizomycète qui la produit. Arch. Néerl. Sci. 24: 341-361.
- GOLDMAN, D. S. 1956a. Enzyme systems in the mycobacteria. I. The isocitric dehydrogenase. J. Bacteriol. 71: 732-736.
- 1956b. Enzyme systems in the mycobacteria. II. The malic dehydrogenase. J. Bacteriol. 72: 401-405.
- GORDON, R. E., W. C. HAYNES et HOR-NAY PANG. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington.
- HERBERT, D. 1955. Catalase from bacteria (*Micrococcus lysodeikticus*). *Dans* Methods in enzymology. Vol. 2. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 784.
- HESTRIN, S., D. S. FEINGOLD et M. SCHRAMM. 1955. Hexoside hydrolases. *Dans* Methods in enzymology. Vol. I. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 231.
- HONG, M. M., S. C. SHEN et A. E. BRAUNSTEIN. 1959. Distribution of L-alanine dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase in *Bacilli*. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 36: 288-289.
- HUGH, R., et E. LEIFSON. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.
- KLAUSHOFER, H., et F. HOLLAUS. 1970. Zur Taxonomie der hochthermophilen, in Zuckerfabrikssäften vorkommenden aeroben Sporenbildner. Z. Zuckerind. Boehm. 20: 465-470.
- KNIGHT, B. C. J. G., et H. PROOM. 1950. A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Microbiol. 4: 508-538.
- LAW, J. H., et R. A. SLEPECKY. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82: 33-36.
- LEMBERG, R., et J. BARRETT. 1973. Bacterial cytochromes and cytochrome oxidases. *Dans* Cytochromes. Academic Press, Inc., New York. p. 217.
- LEMILLE, F., H. DE BARIAC et A. BONNEFOI. 1969. Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe I, appartenant à 9 espèces différentes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 116: 808-819.
- MANDEL, M., C. L. SCHILDKRAUT et J. MARMUR. 1968. Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Dans* Methods in enzymology. Vol. 12 B. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 184.
- MASSEY, V. 1955. Fumarase. *Dans* Methods in enzymology. Vol. I. *Edité par* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. p. 729.
- MİYATA, M., et T. MORI. 1968. Studies on denitrification. VIII. Production of nitric oxide by denitrifying reaction in the presence of tetramethyl-*p*-phenylenediamine. J. Biochem. (Tokyo), 64: 849-861.
- PAYNE, W. J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev. 37: 409-452.

- PFENNIG, N., et H. BIEBL. 1976. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. Arch. Microbiol. 110: 3-12.
- PICHINOTY, F. 1973. La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Bull. Inst. Pasteur, Paris, 71: 317-395.
29. PICHINOTY, F., H. DE BARJAC, M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA. 1976. Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile: *Bacillus azotoformans* n. sp. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127B: 351-361.
- PICHINOTY, F., J.-L. GARCIA, C. JOB et M. DURAND. 1978. La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*. Can. J. Microbiol. 24: 45-49.
- PICHINOTY, F., M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA. 1977. Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe *Pseudomonas stutzeri* isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. Ann. Microbiol. 128A: 75-87.
- PICHINOTY, F., et M. PIÉCHAUD. 1968. Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: méthodes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 114: 77-98.
- RHODES, M. E. 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. J. Gen. Microbiol. 18: 639-648.
- SCHILDKRAUT, C. L., J. MARMUR et P. DOTY. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4: 430-433.
- SHEN, S. C., M. M. HONG et A. E. BRAUNSTEIN. 1959. The main path of nitrogen assimilation in *Bacillus subtilis*. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 36: 290-291.
- SKERMAN, V. B. D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- SMITH, N. R., R. E. GORDON et F. E. CLARK. 1952. Aerobic sporeforming bacteria. Agriculture Monograph No. 16. U.S. Department of Agriculture, Washington.
- STANIER, R. Y. 1976. Réflexions sur la taxonomie des *Pseudomonas*. Bull. Inst. Pasteur, Paris, 74: 255-270.
- STANIER, R. Y., N. J. PALLERON et M. DOUDOROFF. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43: 159-271.
- VERHOEVEN, W. 1952. Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. Thèse, Uitgeverij Waltman, Delft.
- WIDDEL, F., et N. PFENNIG. 1977. A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*. Arch. Microbiol. 112: 119-122.
- WOLF, J., et A. N. BARKER. 1968. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. Dans Identification methods for microbiologists. Part B. Edité par B. M. Gibbs and D. A. Shapton. Academic Press, Inc., New York. p. 93.