

Etude taxonomique de bactéries dénitrifiantes isolées sur benzoate dans des sols de rizières du Sénégal

Jean-Louis GARCIA* (1)
Sevastianos ROUSSOS* (1)
Maurice BENSOUSSAN**

* Microbiologistes ORSTOM
Laboratoire de Microbiologie des Sols
ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

** Laboratoire d'Ecologie et Biochimie
Microbiennes du Milieu Marin
3 Place V. Hugo,
13331 Marseille Cedex 3, France

Résumé

*35 souches de bactéries dénitrifiantes ont été isolées de sols de rizières du Sénégal en utilisant le benzoate comme seule source de carbone pour la dénitrification. Elles ont été étudiées sur la base de 260 caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels. Les résultats ont été soumis à une taxonomie numérique en utilisant le coefficient de similitude de Jaccard (S_j) et le critère de la liaison simple. Cette analyse a permis de regrouper 25 souches en 5 groupes définis par un niveau de 66 à 89 % de similitude. Le phénon 1 regroupe 10 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, le phénon 2, 7 souches de *P. mendocina* et le phénon 3, 4 souches de *P. stutzeri*. Ont également été identifiées une souche d'*Agrobacterium radiobacter*, deux souches du genre *Alcaligenes* et deux souches du genre *Flavobacterium*. Plusieurs espèces dénitrifiantes nouvelles ont été mises en évidence ; deux sont apparentées à *P. putida* ou *P. maltophilia*, une au groupe I du genre *Bacillus* et une espèce capable de fermenter le glucose avec production de gaz est apparentée à *Aeromonas hydrophila*.*

Toutes ces souches ont perdu très rapidement la propriété de dénitrifier en utilisant le benzoate comme seule source de carbone, après conservation sur gélose nutritive.

Mots-clés : Bactéries dénitrifiantes - Benzoate - Rizière - Sénégal - Taxonomie.

Abstract

TAXONOMICAL STUDY OF DENITRIFYING BACTERIA ISOLATED ON BENZOATE IN SENEGALESE RICE FIELDS

*35 strains of denitrifying bacteria have been isolated from rice soils of Senegal by anaerobic enrichment in a minimal medium containing benzoate and nitrate or nitrous oxide. They have been studied on the basis of 260 morphological, physiological, biochemical and nutritional characters. The data were analysed by computer for numerical taxonomy, using the Jaccard coefficient and simple linkage procedure. 25 strains were regrouped in 5 phenetic groups defined at the 66 to 89 % similarity level. 10 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were regrouped in phenon 1, 7 strains of *P. mendocina* in phenon 2 and 4 strains of *P. stutzeri* in phenon 3. The other organisms were identified as *Agrobacterium radiobacter*, 2 strains of *Alcaligenes* and 2 strains of *Flavobacterium*. Several*

(1) Adresse actuelle : Laboratoire de Microbiologie ORSTOM - IRCHA, B.P. n° 1 - 91710 Vert-Le-Petit, France.

supposed new species of denitrifying bacteria were identified as related to *P. putida* and *P. maltophilia*, a new species of genus *Bacillus*, group I, and a fermentative species evolving gases on glucose and related to *Aeromonas hydrophila*.

Unfortunately, all these strains lost quickly their denitrifying ability with benzoate as carbon source, after conservation on nutrient agar.

Key words : Denitrifying bacteria - Benzoate - Paddy soil - Senegal - Taxonomy.

1. INTRODUCTION

L'utilisation des composés aromatiques en aéro-biose est maintenant bien connue et présente plusieurs voies cataboliques (DAGLEY, 1971, STANIER et ORNSTON, 1973) ; l'oxygène moléculaire est indispensable pour le clivage du noyau benzénique. L'utilisation des composés aromatiques en anaérobiose par les microorganismes a, par contre, été peu étudiée. Ce processus a été démontré dans le cas de bactéries méthanigènes (CLARK et FINA, 1952) et pour la bactérie photosynthétique *Rhodospseudomonas palustris* (GUYER et HEGEMAN, 1969). OSHIMA (1965) fut le premier à déceler, dans une culture mixte de bactéries, une croissance anaérobie au dépens de composés aromatiques en présence de nitrate. Puis TAYLOR et coll. (1970, 1972) ont isolé du sol une souche de

Pseudomonas capable de dénitrifier en présence de plusieurs composés aromatiques comme seules sources de carbone. Enfin WILLIAMS et EVANS (1975) ont obtenu un résultat équivalent avec une souche de *Moraxella*.

Dans le sol, l'oxydation des composés aromatiques, qui sont des unités structurales significatives de l'humus, nécessite la participation de l'oxygène moléculaire couplée à l'action de dioxygénases. Ainsi une fraction non négligeable de la matière organique du sol serait non disponible dans les sols anoxiques comme les sols de rizières submergées. La découverte d'une voie de dégradation anaérobie des composés aromatiques ouvre d'intéressantes perspectives mais la signification écologique de cette réaction reste obscure.

TABLEAU I

Origine des souches

Isolement sur N ₂ O		Isolement sur KNO ₃	
N° Souche	Origine du sol	N° Souche	Origine du sol
1	Pont-Gendarme 2 (Fleuve)	21	Faoune (Casamance)
2	Pont-Gendarme 4 —	22	Bignona —
3	Pont-Gendarme 4 —	23	Bignona —
4	Pont-Gendarme 6 —	24	Boughari —
5	Pont-Gendarme 6 —	25	Pont-Gendarme 5 (Fleuve)
6	Pont-Gendarme 7 —	26	Pont-Gendarme 8 —
7	Pont-Gendarme 5 —	27	Pont-Gendarme 9 —
8	Faoune (Casamance)	28	Ros-Béthio —
9	Faoune —	29	Ntiagar —
10	Séfa —	30	Ndiago —
11	Séfa —	31	Gankette —
12	Sédhiou —	32	Gankette —
13	Djana Malari —	33	Keur Momar Sarr 1 —
14	Djibelor —	34	Keur Momar Sarr 2 —
15	Bignora —	35	Keur Momar Sarr 3 —
16	Fassan —		
17	Fassan —		
18	Djibelor El —		
19	Nyambalang —		
20	Enampor —		

C'est pourquoi il nous est apparu intéressant d'essayer d'isoler, à partir de sols de rizière, une collection de souches dénitrifiantes capables d'utiliser le benzoate comme seule source de carbone lors de la dénitrification.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. ISOLEMENT DES SOUCHES

L'isolement des 35 souches dénitrifiantes a été effectué à partir de différents sols de rizière provenant des deux régions rizicoles du Sénégal, la Casamance et la Région du Fleuve (Tabl. I), par culture d'enrichissement dans un milieu minimal liquide contenant 2 g/litre de benzoate de sodium et tamponné à pH7 (Na_2HPO_4 , 12 H_2O , 3,775 g ; KH_2PO_4 0,98 g ; MgSO_4 , 7 H_2O , 30 mg, NH_4Cl , 0,5 g ; solution d'oligoéléments d'AUGIER (1956), 0,2 ml ; FeSO_4 , 10 mg ; eau distillée, 1.000 ml). 50 ml de milieu ont été mis en incubation à 30° C en anaérobiose dans des ballons remplis de N_2O ou de N_2 ; dans ce deuxième cas, KNO_3 (5 g/l) constituait l'accepteur d'électrons. Après plusieurs passages, les isolements ont été effectués sur le même milieu gélosé mis en incubation aérobie à 30° C. Après plusieurs étalements successifs, la pureté des cultures a été vérifiée. Les bactéries ainsi isolées ont été entretenues sur gélose nutritive.

2.2. CONTROLE DE L'APTITUDE A LA DÉNITRIFICATION

La réduction du nitrate en gaz a été testée sur Nutrient Broth Difco additionné de 5 g/l de KNO_3 , à l'aide du réactif des nitrites de Griess-Ilosvay et de la poudre de zinc (FOCHT et JOSEPH, 1973). La production de gaz a également été recherchée sur milieu minimal faiblement gélosé (2 g/l) en présence de benzoate de sodium et de KNO_3 . D'autre part, une analyse de l'atmosphère des cultures sur Nutrient Broth et KNO_3 a été réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse.

2.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE

L'aspect des colonies (diamètre, élévation, contour, surface, consistance, pigmentation) a été déterminé après croissance sur Nutrient Agar Difco en boîtes de Pétri ; la morphologie cellulaire (forme, mensurations, mobilité, arrangement cellulaire) a été examinée au microscope sur des cellules après croissance sur Nutrient Broth en notant l'aspect de la culture (importance et aspect du trouble, pellicule en surface). La coloration de Gram a été effectuée sur des jeunes cellules et les flagelles mis en évidence par

la technique de RHODES (1958). Les capsules ont été recherchées en présence d'encre de chine et l'accumulation de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) révélée par coloration au noir soudan des cellules après croissance aérobie en présence de 2% de DL-3-hydroxybutyrate.

2.4. TESTS CLASSIQUES

L'oxydase a été recherchée sur papier filtre selon la technique de KOVACS (1956) et la catalase révélée par H_2O_2 à 10 volumes sur les colonies en boîtes de Pétri. On a mis en évidence l'hydrolyse de l'urée sur le milieu de Fergusson modifié par ROLAND *et coll.* (1947) et la fermentation des sucres (glucose, saccharose, maltose, mannitol, mannose et xylose) sur le milieu de HUGH et LEIFSON (1953).

L'activité d'enzymes extracellulaires sur des milieux peptonés enrichis en macromolécules organiques (amidon, gélatine, jaune d'œuf, tween 80) ajoutées à raison de 2 g/l, a été révélée par l'apparition d'auréoles autour des colonies ; ces zones claires ont été lues directement dans le cas du jaune d'œuf et du tween 80 (SIERRA, 1957) ou révélées par des réactifs : réactif iodo-ioduré pour l'amidon et le chlorure mercurique selon FRAZIER (1926), pour la gélatine. La production de di-hydroxyacétone en boîte de Pétri a été révélée avec le réactif de Fehling selon GORDON *et coll.* (1973).

La recherche des décarboxylases de la lysine et de l'ornithine ainsi que l'arginine dihydrolase a été faite en milieu liquide selon la méthode de RICHARD (1968).

Les tests suivants ont été réalisés par les procédés décrits par SKERMAN (1967) : réaction de Voges-Proskauer, rouge de méthyl, productions d' H_2S et d'indole, croissance en milieu au citrate de Simmons. La recherche de la tryptophane désaminase (TDA) a été faite à partir du milieu de Fergusson modifié par ROLAND *et coll.* (1947) en ajoutant une goutte de perchlorure de fer dilué au 1/3 dans de l'eau ; une réaction positive se traduit par la coloration immédiate brun-rouge du milieu. La production éventuelle d'un pigment fluorescent a été recherchée sur les milieux de KING *et coll.* (1954).

Le milieu suivant a été utilisé pour tester l'assimilation du nitrate comme seule source d'azote : KH_2PO_4 , 0,5 g ; K_2HPO_4 , 0,5 g ; MgSO_4 , 0,2 g ; NaCl , 0,1 g ; CaCl_2 , 0,1 g ; FeSO_2 , 10 mg ; acide malique, 4 g ; glucose 2 g ; KNO_3 , 1 g ; solution d'oligoéléments, 1 ml ; eau distillée q.s.p. 1.000 ml ; pH ajusté à 6,8 avec KOH.

2.5. ETUDE PHYSIOLOGIQUE

Le temps de génération a été estimé à 30° C sur Nutrient Broth Difco à l'aide d'un biophotomètre enregistreur de Bonnet-Maury et Jouan (Jouan-Quétin, Paris). Sur ce même milieu ont été testées les croissances à différentes températures (4°, 12°, 22°, 37°, 41°, 43°) et à différents pH (5, 6, 8, et 9) ainsi que la tolérance à des concentrations élevées en différents substrats : NaCl 0,5 %, KNO₃ 8 %, KNO₂ 0,5 %, azoture 0,03 %. La croissance anaérobie a été testée en atmosphère d'azote pur en employant les accepteurs d'électrons suivants : KNO₃, 0,5 % ; KNO₂, 0,5 % ; K₂S₄O₆, 0,2 % ; Na₂S₂O₃, 0,2 % ; fumarate de sodium, 0,2 %. On a également testé la croissance en atmosphère pure de N₂O.

La prototrophie vis à vis du glucose a été testée sur le milieu minimal précédent (c.f. § 2.1.) additionné de 2g/l de glucose.

2.6. TESTS NUTRITIONNELS

Cette étude a été inspirée de celle réalisée par STANIER *et coll.* (1966) sur le genre *Pseudomonas*. Les cultures ont été réalisées sur milieu solide en boîte de Pétri, composé de la solution de base suivante : Na₂HPO₄, 12H₂O, 3,77 g ; KH₂PO₄ 0,98 g ; NH₄Cl, 0,5 g ; MgSO₄, 7H₂O, 30 mg ; tampon tris-HCl M, pH 7,5 10 ml ; solution d'oligoéléments, 1 ml ; agar Noble Difco, 15 g ; eau distillée q.s.p., 1.000 ml. 155 substrats organiques constituant l'unique source de carbone et d'énergie ont été testés à raison de 2 g/l pour les glucides et de 1 g/l pour les autres composés à l'exception du phénol dont la concentration a été réduite à 0,25 g/l. Tous ces substrats ont été ajoutés au milieu stérile refroidi (45°) après filtration (Millipore 0,45 μ), ainsi que 2 ml/l d'une solution complexe de facteurs de croissance (Vitamines et coenzymes) (Roussos, 1977), exceptés le géraniol et le naphthalène qui ont été déposés dans le couvercle des boîtes de Pétri après leur ensemencement.

Cet ensemencement a été réalisé au moyen d'un inoculateur multipoint selon la méthode de LOVELACE et COLWELL (1968) à partir de cultures jeunes prélevées dans de l'eau distillée stérile sur milieu gélosé. Après 15 jours d'incubation, la présence ou l'absence de croissance a été déterminée par rapport à un témoin sans substrat carboné. Seules les croissances franches ont été retenues, les croissances dues à des mutations ont été écartées.

2.7. ANALYSE NUMÉRIQUE

Les caractères ont été codés « 1 » pour positif ou présent et « 0 » pour négatif ou absent. La matrice

contenait 35 souches et 260 caractères. Pour le calcul des similitudes entre souches, les données ont été traitées en utilisant le coefficient de Jaccard S_j (SNEATH, 1957) qui ne tient pas compte des réponses négatives. Les regroupements entre individus ont été effectués par un ordinateur PDP 11 qui utilise un programme de liaison simple disponible au Laboratoire de Microbiologie du Milieu Marin de L'Université de Provence (Marseille).

3. RÉSULTATS

TABLEAU II

Caractères négatifs pour l'ensemble des 35 souches étudiées

Caractères morphologiques	Caractères biochimiques	Substrats carbonés
Cocci	indole	L-xylose
Spore terminale	TDA	Inuline
Spore déformante	RM	Sedoheptulose
Cellules en longues chaînes	tetrathionate	D (-) Tartrate
Cellules en tétrades		Tartronate
Colonie transparente		Isopropanol
Colonie incrustée		D-Mandélate
Pigment rose		Terephthalate
Trouble floconneux		trans-cinnamate

Les 22 caractères suivants ne sont pas discriminants car négatifs pour toutes les souches : 9 caractères morphologiques, 4 caractères biochimiques et 9 substrats carbonés non utilisés (Tabl. II). Ces caractères ont été exclus de la matrice finale qui comprenait donc 238 caractères.

L'emploi du coefficient de Jaccard S_j a permis de regrouper 25 souches soit 71 % de l'ensemble des 35 souches testées, en 5 groupes définis par un niveau de 63 à 89 % de similitude (S) (Fig. 1). La croissance anaérobie sur benzoate a été peu abondante et diminuait tout au long de la purification. Les souches pures, maintenues sur agar nutritif, ont perdu très rapidement la capacité de dénitrifier en présence de benzoate. 5 souches n'ont pas utilisé ce composé en aérobiose lors des tests nutritionnels.

Trois souches (les souches 3, 6 et 16) tout d'abord retenues comme dénitrifiantes, ont perdu cette propriété et ont été écartées de la description finale. L'une d'entre elles appartient au phénon 4 qui regroupe 2 souches seulement, comme le phénon 5 dont nous décrivons les 2 souches séparément.

3.1. IDENTIFICATION ET DESCRIPTION DES PHÉNONS

Les caractéristiques des phénons 1, 2 et 3 sont données dans les tableaux III, IV, V, VI et VII.

3.1.1. *Le phénon 1* qui contient 10 souches est le plus homogène puisqu'il est défini à 89 % de similitude. Il s'agit donc d'une espèce étroite dont les caractères principaux correspondent à ceux décrits dans le travail de base de STANIER *et coll.* (1966) pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Ce sont, en effet, des bâtonnets gram négatifs, mobiles par un flagelle polaire. Les colonies produisent un pigment bleu-vert de pyocyanine (milieu King A). Ces organismes croissent à 43° mais non à 4°, possèdent l'arginine dihydrolase, n'accumulent pas de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) et n'hydrolysent pas l'amidon. Ils utilisent 79 à 82 substrats carbonés dont le mannitol, le géraniol, l'arginine, l'histidine, la bétaine et la sarcosine. Ils n'utilisent pas le xylose, le maltose, le saccharate, l'éthylène glycol et le glycolate.

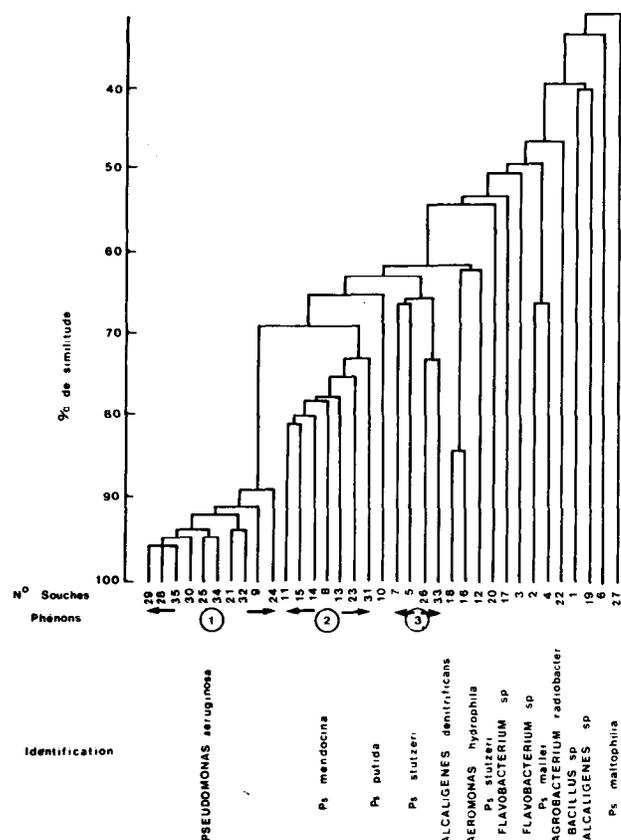


FIG. 1. - Dendrogramme des souches isolées sur benzoate établi selon le coefficient de Jacard S_j et le critère de la liaison simple.

3.1.2. *Le phénon 2* défini à 73 % de similitude, contient 7 souches.

Ce sont des bâtonnets gram négatifs, mobiles par un flagelle polaire, oxydase et catalase positifs et présentant un métabolisme de type oxydatif. La croissance anaérobie n'a lieu qu'en présence de nitrate, nitrite ou oxyde nitreux. Cette description répond à la définition du genre *Pseudomonas*, et les caractères généraux de ces 7 souches nous permettent, selon l'étude de PALLERONI *et coll.* (1970) de les classer dans l'espèce *P. mendocina*. En effet, ces organismes croissent à 41° mais non à 4°, n'accumulent pas de PHB, produisent un pigment caroténoïde crème ou jaunâtre, possèdent l'arginine dihydrolase mais n'hydrolysent ni l'amidon, ni la gélatine. Ils utilisent de 65 à 70 composés carbonés dont le saccharate, le géraniol, le levulinate, l'arginine, l'histidine, la bétaine et la sarcosine. Ils n'utilisent pas le xylose, le maltose, et le mannitol. La souche 31 utilise 82 substrats dont un grand nombre d'hydrates de carbone non ou peu utilisés par les autres souches.

3.1.3. *Le phénon 3* regroupe 4 souches présentant entre elles seulement 63 % de similitude. Mais ces organismes répondent d'assez près à la définition de l'espèce *P. stutzeri* qui représente, selon la description de STANIER (1976) et de PICHINOTY *et coll.* (1977), une espèce large. Ces organismes gram négatifs, sont mobiles par un flagelle polaire, n'accumulent pas de PHB, croissent à 43° mais pas à 4°, ne forment pas de pigment mais présentent souvent des colonies à surface plissée et rugueuse. Ils ne possèdent pas l'arginine dihydrolase mais hydrolysent l'amidon et le jaune d'œuf. Ces souches montrent une variabilité nutritionnelle de 46 à 58 substrats carbonés en utilisant notamment le maltose, l'amidon, le glycollate et l'éthylène glycol. Elles n'utilisent pas le xylose, le L-arabinose, le galactose, le cellobiose, le 2-cetogluconate, le géraniol, la β -alanine, l'histidine, l'arginine, le levulinate, la sérine, la bétaine et la sarcosine.

3.2. IDENTIFICATION ET DESCRIPTION DES SOUCHES ISOLÉES

Nous effectuerons cette description en nous déplaçant de la gauche vers la droite du dendrogramme de la fig. 1. Les caractéristiques des souches figurent aux tableaux III à VII.

3.2.1. *La souche 10* qui se situe entre les phénons 2 et 3, est un bâtonnet court, gram négatif à ciliation lophotriche. Il est oxydase et catalase positif et présente un métabolisme oxydatif. Il ne croît en anaérobie qu'en présence de nitrate, nitrite ou oxyde nitreux. Il est prototrophe et n'accumule pas de PHB. Il

croît à 37° mais pas à 40° ni à 4° ; les colonies ont une surface lisse et produisent un pigment fluorescent. Cet organisme répond aux descriptions de *P. putida* données par STANIER *et coll.* (1966) et la 8° édition du Manuel de Bergey (BUCHANAN et GIBBONS, 1974. Il

possède l'arginine dihydrolase et n'hydrolyse pas la gélatine, l'urée, l'amidon, le tween 80 et le jaune d'œuf. Il assimile le nitrate et utilise 84 composés carbonés dont le glucose, le céto gluconate, la β-alanine, la valine, l'arginine et la benzylamine.

TABLEAU III

Caractéristiques des phénons et des souches isolées

Caractères	Phénons et Souches													
	Phénon 1	Phénon 2	10	Phénon 3	18	12	20	17	2	4	22	1	19	27
<i>Caractères morphologiques</i>														
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciliation polaire	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ciliation lophotriche	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ciliation péritriche	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Capsule	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigment vert	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigment jaune	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Caractères biochimiques</i>														
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse Gélatine	+	-	-	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Hydrolyse Amidon	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Hydrolyse Tween 80	+	-	-	±	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Hydrolyse Jaune d'œuf	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Hydrolyse Urée	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Formation dihydroxyacétone	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation Glucose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Prototrophie Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Assimilation KNO ₃	+	+	+	±	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
H ₂ S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine décarboxylase	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Ornithine décarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PHB	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Assimilation substrats carbonés</i>														
<i>Sucres et dérivés</i>														
D-Ribose	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Xylose	-	±	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
L-Arabinose	-	±	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Mannose	+	±	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
D-Galactose	-	±	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Saccharose	-	±	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Tréhalose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

TABLEAU IV

Caractéristiques des phénons et des souches isolées

Caractères assimilation substrats carbonés	Phénons et Souches													
	Phénon 1	Phénon 2	10	Phénon 3	18	12	20	17	2	4	22	1	19	27
<i>Sucres et dérivés</i>														
Cellobiose	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Desoxyribose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2-cetogluconate	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Saccharate	+	±	+	±	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Mucate	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Sedoheptulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acides gras</i>														
Acétate	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Propionate	+	+	+	±	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Butyrate	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Isobutyrate	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Valérate	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Isovalérianate	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Caproate	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Palmitate	+	-	-	±	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Laurate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Pelargonate	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Caprate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Acides dicarboxyliques</i>														
Oxalate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Malonate	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Maleate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Fumarate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Glutarate	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Adipate	+	±	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Pimelate	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Suberate	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Crotonate	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Sebacate	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2-oxo-glutarate	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Comme le biotype A de l'espèce *P. putida*, il n'utilise pas le tréhalose, le xylose, le L-tryptophane, la testostérone, le L-kynurenate, l'antranilate, la tryptamine et le géranol. Le caractère original de cette souche est sa capacité à dénitrifier les oxydes minéraux de l'azote, phénomène qui n'avait jamais été décrit jusqu'à présent chez *P. putida*.

3.2.2. *La souche 18* est une bacille court, gram négatif, mobile par plusieurs flagelles péritriches. Il est prototrophe, oxydase et catalase positif et ne fermente pas la glucose. Cette description correspond à la définition du genre *Alcaligenes*. Notre souche hydrolyse l'urée, le twen 80 et le jaune d'œuf mais pas la gélatine ni l'amidon. Elle possède une lysine dé-

TABLEAU V
Caractéristiques des phénons et des souches isolées

Caractères assimilation substrats carbonés	Phénons et Souches													
	Phénon 1	Phénon 2	10	Phénon 3	18	12	20	17	2	4	22	1	19	27
<i>Hydroxyacides</i>														
D-Malate	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
L-Malate	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D(-)-Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L(+)-Tartrate	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mesotartrate	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DL-β-Hydroxyburate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
DL-Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Glycollate	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
DL-Glycérate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Hydroxymethylglutarate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acides organiques divers</i>														
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Aconitate	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Laevulinate	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Citraconate	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Itaconate	+	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Mesaconate	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Formiate	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Formate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tartronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucuronate	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
DL-Isocitrate	-	-	+	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cis-Aconitate	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Trans-Aconitate	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Polyalcools et Glycols</i>														
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Mannitol	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Glycérol	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Ethylèneglycol	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propane, 1-2, diol	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Butane, 2, 3, diol	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
2-Phényléthanol	-	±	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

carboxylase et assimile le nitrate. Elle croît de 12 à 41° mais n'accumule pas de PHB. Elle utilise 89 substrats carbonés dont 16 hydrates de carbone. Si on se réfère à la récente étude de PICHINOTY *et coll.* (1978) sur le genre *Alcaligenes*, la seule espèce dénitrifiante reconnue est *A. denitrificans*. Notre souche

semble très voisine de la souche 4 atypique de PICHINOTY *et coll.* (1978) car comme elle, elle utilise le 2-cetogluconate, le *para*-hydroxybenzoate et le quinate et elle est incapable d'assimiler l'adipate, le pimélate, le subérate, le *méso*-tartrate et l'itaconate. Par contre, elle utilise le saccharate et la L-phénylalanine

TABLEAU VI

Caractéristiques des phénons et des souches isolées

Caractères assimilation substrats carbonés	Phénons et Souches													
	Phénon 1	Phénon 2	10	Phénon 3	18	12	20	17	2	4	22	1	19	27
<i>Alcools</i>														
Méthanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
n-propanol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-butanol	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Isobutanol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Géranol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Composés aromatiques non azotés</i>														
D-Mandélate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Mandélate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Benzoylformate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Benzoate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
O-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
m-Hydroxybenzoate	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
p-Hydroxybenzoate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Phtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Isophtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Terephtalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phénylacétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Trans-cinnamate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phénol	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Quinate	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Testostérone	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acides aminés aliphatiques</i>														
Glycocolle	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
L- α -Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
D- α -Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
β -Alanine	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DL-Sérine	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
DL-Thréonine	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L-Leucine	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DL-Isoleucine	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
DL-Norleucine	+	-	+	±	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
DL-Valine	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L-Aspartate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L-Lysine	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-

contrairement à la souche 4 de Pichinoty. L'incapacité à accumuler le PHB, signalée également par d'autres auteurs pour cette espèce, peut s'expliquer par la faible sensibilité de la technique cytologique, car les souches décrites par PICHINOTY *et coll.* (1978) accumulent toutes du PHB.

3.2.3. La souche 12 est un coccobacille gram variable, mobile par un flagelle polaire et doué d'une activité fermentaire ; cet organisme fermente, en effet, le glucose avec production de gaz (CO₂ et H₂). Il possède en outre une capsule. Il est faiblement oxydase positif et également catalase positif. Seule

TABLEAU VII

Caractéristiques des phénons et des souches isolées

Caractères assimilation substrats carbonés	Phénons et Souches													
	Phénon 1	Phénon 2	10	Phénon 3	18	12	20	17	2	4	22	1	19	27
<i>Acides aminés aliphatiques</i>														
L-Arginine	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
DL-Ornithine	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
L-Citrulline	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
DL- α -Aminobutyrate	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-Aminobutyrate	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
DL-Norvaline	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Asparagine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Méthionine	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
L (+) Cystéine	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L-Cystine	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Acides aminés aromatiques</i>														
L-Histidine	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
L-Tyrosine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L-Phénylalanine	+	±	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
DL-Tryptophane	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Kynurenate	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Anthranilate	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
O-aminobenzoate	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
P-aminobenzoate	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Amines</i>														
Méthylamine	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Ethanolamine	+	+	+	±	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Benzylamine	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Putrescine	+	+	+	±	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Spermine	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Histamine	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Tryptamine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butylamine	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Composés azotés divers</i>														
Bétaïne	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Sarcosine	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Créatine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hippurate	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Panthoténate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Acétamide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinate	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Hydrocarbures</i>														
n-Dodecane	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
n-Hexadecane	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-

l'urée est hydrolysée. Le test de Voges-Proskauer (VP) est positif. Le nitrate est assimilé et dénitrifié jusqu'au stade N_2O seulement. Cette souche croît de 12° à 41° et n'accumule pas de PHB. Elle présente une croissance anaérobie positive sur fumarate et utilise 97 substrats carbonés dont tous les hydrates de carbone testés excepté le sedoheptulose. Sont également fermentés avec production de gaz le saccharose, le maltose, le mannitol, le mannose, le xylose et le lactose. L'activité fermentaire avec production de gaz, la flagellation polaire monotriche, l'oxydase positive et le test VP positif nous permettent de classer cette souche, selon le Manuel de Bergey, dans le genre *Aeromonas* et plus spécialement dans l'espèce *A. hydrophila* pour laquelle cependant il n'est pas signalé la présence d'une capsule. La détermination du GC % de l'ADN permettra ultérieurement peut-être de confirmer cette présomption de classification. Mais le principal intérêt de l'étude de cette souche est son aptitude à fermenter le glucose avec production de gaz. C'est en effet la première fois que ce caractère est observé chez une bactérie dénitrifiante.

3.2.4. *La souche 20* est un bâtonnet gram négatif possédant un flagelle polaire, oxydase et catalase positif, n'accumulant pas de PHB et croissant de 12° à 41°. Il possède une lysine décarboxylase mais pas l'arginine dihydrolase. Seule l'urée est hydrolysée. 69 substrats carbonés sont assimilés dont très peu de sucres. Le géranol n'est pas utilisé ainsi que les amines. Cette souche peut donc être classée dans l'espèce large, *P. stutzeri* déjà identifiée dans le phénon 3.

3.2.5. *Les souches 17 et 2* sont des bâtonnets gram négatif immobiles (2) ou munis de flagelles péritriches (17) et présentent tous deux des colonies pigmentées en jaune. Ils sont oxydase négatifs (17) ou positifs (2), catalase positifs et accumulent du PHB. Ils sont prototrophes et présentent seulement un métabolisme oxydatif, avec possibilité de croissance anaérobie en présence d'un composé oxygéné minéral de l'azote. La température de croissance est 30° ; la souche 17 peut atteindre 37°. L'urée est hydrolysée dans les deux cas mais seule la souche 2 hydrolyse la gélatine, l'amidon, le tween 80 et le jaune d'œuf. Le nitrate n'est pas assimilé et 66 à 68 composés carbonés sont utilisés pour la croissance mais des différences très marquées caractérisent cependant ces 2 souches sur le plan de la nutrition carbonée. Ces caractéristiques et notamment la présence d'un pigment jaune et la température de croissance très limitée font penser, selon le Manuel de

Bergey et selon PICHINOTY *et coll.* (1976) à deux espèces du genre *Flavobacterium*.

3.2.6. *La souche 4* est un bâtonnet gram négatif, immobile, oxydase et catalase positif. Elle accumule du PHB et ses colonies ne produisent pas de pigment. Seuls la gélatine et le tween 80 sont hydrolysés. Cette souche ne croît qu'à 30° seulement et n'assimile pas le nitrate. Elle ne fermente pas le glucose et utilise 53 composés carbonés. Cette description se rapproche de la seule espèce aciliée du genre *Pseudomonas*, *P. mallei*, également dénitrifiante, qui croît cependant à 42° et utilise 46 substrats carbonés (REDFEARN *et coll.*, 1966). Il existe cependant, entre notre souche 4 et les souches décrites dans l'étude de référence, beaucoup de différences nutritionnelles. Si notre souche n'assimile pas, comme *P. mallei*, le D-ribose, le valérate, le caprate, le levulinate, l'érythritol, le glycolle, la L-lysine, la testostérone, la butylamine et l' α -amylamine, elle utilise, contrairement à l'espèce de référence, le mucate, l'isobutyrate, le caproate, le pélargonate, la L-isoleucine, le *m*-hydroxybenzoate, le kynurenate et l'éthanolamine. Utilisant comme *P. mallei* l'amidon, le *p*-hydroxybenzoate et l'arginine, elle n'assimile pas, contrairement à celui-ci, le cellobiose, le D-xylose, l'adipate, le DL- α -aminobutyrate, la L-thréonine et la bétaïne. Seule une détermination du GC % de l'ADN nous permettra de conclure définitivement sur l'identité de la souche 4.

3.2.7. *La souche 22* est un petit bâtonnet gram négatif, non sporulé, mobile par le moyen de flagelles péritriches, oxydase et catalase positif. Il ne fermente pas le glucose et n'accumule pas de PHB. On n'observe aucune croissance à 4° et 41°. L'organisme assimile le nitrate et seule l'urée est hydrolysée. 50 composés carbonés sont utilisés. Cette description est très voisine de celle de l'espèce *Agrobacterium radiobacter* donnée par PICHINOTY (1977) malgré quelques différences nutritionnelles. Notre souche assimile 8 composés non utilisés par les souches de Pichinoty (maléate, subérate, glycollate, *p*-hydroxybenzoate, D- α -alanine, DL-isoleucine, L-lysine et spermine) et n'utilise pas 12 substrats assimilés par les souches de Pichinoty (saccharate, lactose, mannitol, glycérol, éthanol, propanol, acétate, L-malate, cis-aconitate, quinate, glutamine et éthanolamine).

3.2.8. *La souche 1* est un bâtonnet gram négatif, présentant une spore centrale non déformante, mobile par le moyen de flagelles péritriches et à métabolisme respiratoire. Il n'accumule pas de PHB, exige

des facteurs de croissance et assimile 35 substrats carbonés dont aucun acide gras. Il s'agit donc d'une espèce de *Bacillus* appartenant au groupe I, mais qui diffère nettement de *B. licheniformis* et de *B. subtilis* (DURAND *et coll.*, 1979) qui sont oxydase négatifs, hydrolysent la gélatine et l'amidon et sont VP positifs.

3.2.9. *La souche 19* est un bâtonnet gram négatif, à flagellation péritriche, oxydase et catalase positif, à métabolisme respiratoire et non prototrophe. Le PHB n'est pas accumulé et seule l'urée est hydrolysée. Seulement 20 substrats carbonés sont assimilés dont 6 hydrates de carbone, 6 acides gras, 1 acide organique, le succinate et 7 composés aromatiques. Il pourrait s'agir d'une espèce du genre *Alcaligenes*.

3.2.10 *La souche 27* est un petit bâtonnet gram négatif, à flagellation lophotriche, oxydase négatif et catalase positif, à métabolisme respiratoire et non prototrophe. La gélatine, le tween 80 et le jaune d'œuf sont hydrolysés. L'organisme n'accumule pas de PHB et possède une lysine décarboxylase. Il croît de 4° à 41° et n'assimile qu'un très petit nombre de composés carbonés (palmitate, laurate, caprate, L-aspartate et histamine). Cette description se rapproche de celle de la seule espèce du genre *Pseudomonas* oxydase négative, *P. maltophilia* qui, comme la souche 27, est lophotriche, non prototrophe (elle exige la méthionine), hydrolyse la gélatine et le tween 80, n'assimile pas le nitrate et utilise peu de substrats carbonés (STANIER *et coll.*, 1966). La détermination du GC % de l'ADN serait utile pour confirmer cette identification présumée, d'autant plus que cette espèce n'est pas signalée comme dénitrifiante.

4. DISCUSSION

La croissance anaérobie aux dépens d'un composé aromatique, le benzoate, lors de la respiration d'un composé minéral de l'azote (nitrate ou oxyde nitreux) nous a permis d'isoler plusieurs souches intéressantes. Malheureusement, les bactéries isolées perdent assez rapidement la propriété de dénitrifier en présence de benzoate comme seule source de carbone lorsqu'on les conserve sur gélose nutritive. Quoiqu'il en soit, cet isolement a révélé quelques souches dénitrifiantes originales.

Il a tout d'abord permis de confirmer les travaux de TAYLOR *et coll.* (1970, 1972), qui ont isolé un

Pseudomonas fluorescent que l'on peut apparenter au groupe le plus important de notre étude, c'est-à-dire le phénon 1 qui regroupe 10 souches de *P. aeruginosa*.

Nous n'avons pas trouvé dans nos isolats de souche appartenant au genre *Moraxella* décrit par WILLIAMS et EVANS (1975) comme pouvant dénitrifier sur benzoate quoique la souche 4 présente certaines ressemblances avec la description de ce genre, notamment l'absence de flagelle. Mais les *Moraxella*, qui sont pathogènes dans leur grande majorité, n'utilisent pas les hydrates de carbone alors que la souche 4 en a utilisé 9.

Hormis les espèces dénitrifiantes classiques comme *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *Alcaligenes denitrificans*, cette étude a également permis de confirmer l'aptitude à dénitrifier de *Agrobacterium radiobacter* signalée par PICHINOTY *et coll.* (1977) et d'espèces du genre *Flavobacterium* récemment mentionné par PICHINOTY *et coll.* (1976) et GAMBLE *et coll.* (1977).

Enfin, plusieurs souches dénitrifiantes originales ont été mises en évidence. Deux souches apparentées à deux espèces du genre *Pseudomonas* non dénitrifiantes ont ainsi pu être décrites : *P. putida* et *P. maltophilia*. Une souche sporulée du genre *Bacillus* a été isolée ; elle ne correspond à aucune espèce dénitrifiante de ce genre : *B. licheniformis* (PICHINOTY *et coll.*, 1978), *B. azotoformans* (PICHINOTY *et coll.*, 1979) ; ces souches, excepté *B. licheniformis*, possèdent, en effet, une spore déformante et appartiennent au groupe II du genre *Bacillus*. Elle ne ressemble pas également à une nouvelle espèce de ce genre récemment isolée par PICHINOTY et MANDEL (1978) sur quinate.

La nouvelle souche dénitrifiante la plus remarquable est l'espèce apparentée à *Aeromonas hydrophila* qui fermente le glucose et le lactose en CO₂ + H₂. Une partie des nouveaux *Bacillus* dénitrifiants isolés au Sénégal par Garcia (PICHINOTY *et coll.*, 1979) sont capables de fermenter le glucose avec production d'acides ; mais on ne connaissait pas jusqu'à présent de bactérie dénitrifiante pouvant produire du gaz lors de la fermentation du glucose. Des analyses du GC % de l'ADN de ces nouvelles bactéries dénitrifiantes seront réalisées ultérieurement pour confirmer leur identité présumée.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM, le 8 août 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- AUGIER (J.), 1956. - A propos de la numération des *Azotobacter* en milieu liquide *Ann. Inst. Pasteur*, 91 : 759-765.
- BUCHANAN (R.E.) et GIBBON (N.E.), 1974. - *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, Eighth ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- CLARK (F.M.) et FINA (L.R.), 1952. - The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. *Arch. Biochem.*, 36 : 26-32.
- DAGLEY (S.) 1971. - Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Microbial. Physiol.* 6 : 1-16.
- DURAND (M.), PICHINOTY (F.), JOB (C.) et MANDEL (M.), 1979. - Nutrition carbonée et étude taxonomique de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis*. *Can. J. Microbiol.* 25 : 491-498.
- FOCHT (D.D.) et JOSEPH (H.), 1973. - An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 37 : 698-699.
- FRAZIER (W.C.), 1926. - A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.* 39 : 302-309.
- GAMBLE (T.N.), BETLACH (M.R.) et TIEDJE (J.M.), 1977. - Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 926-939.
- GORDON (R.E.), HAYNES (W.C.) et HOR-NAY PANG, 1973. - The genus *Bacillus*, In « Agriculture Handbook » N° 427, U.S. Department of Agriculture, Washington.
- GUYER (M.) et HEGEMAN (G.D.), 1969. - Evidence for a reductive pathway for the anaerobic metabolism of benzoate. *J. Bacteriol.* 99 : 906-907.
- HUGH (R.) et LEIFSON (E.), 1953. - The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66 : 24-26.
- KING (E.O.), WARD (M.K.) et RANEY (D.E.), 1954. - Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44 : 301-307.
- KOVACS (N.), 1956. - Identification of *Pseudomonas pyocyana* by oxydase reaction. *Nature (Lond.)*, 178 : 703.
- LOVELACE (T.E.) et COLWELL (R.R.), 1968. - A multipoint inoculator for Petri dishes. *Appl. Microbiol.* 18 : 944-945.
- OSHIMA (T.), 1965. - On the anaerobic metabolism of aromatic compounds in the presence of nitrate by soil microorganisms. *Z. Allg. Microbiol.*, 5 : 386-394.
- PALLERONI (N.J.), DOUDOROFF (M.), STANIER (R.Y.), SOLANES (R.E.) et MANDEL (M.), 1970. - Taxonomy of the aerobic pseudomonads : the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. Gen. Microbiol.* 60 : 215-231.
- PICHINOTY (F.), BIGLIARDI-ROUVIER (J.), MANDEL (M.) GREENWAY (B.), METENIER (G.) et GARCIA (J.-L.), 1976. - The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42 : 349-354.
- PICHINOTY (F.), DURAND (M.), JOB (C.), MANDEL (M.) et GARCIA (J.-L.), 1978. - Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 608-617.
- PICHINOTY (F.), GARCIA (J.-L.), JOB (C.) et DURAND (M.), 1978. - La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 45-49.
- PICHINOTY (F.) et MANDEL (M.), 1978. - The isolation and properties of a mesophilic *Bacillus* species utilizing quinate, p-Hydroxy-benzoate, and phthalate as sources of carbon and energy. *Curr. Microbiol.*, 1 : 269-271.
- PICHINOTY (F.), MANDEL (M.) et GARCIA (J.-L.), 1977. - Etude de six souches de *Agrobacterium tumefaciens* et *A. radiobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 A : 303-310.
- PICHINOTY (F.), MANDEL (M.) et GARCIA (J.-L.), 1979. - The properties of novel mesophilic denitrifying *Bacillus* cultures found in tropical soils. *J. Gen. Microbiol.* 155 : 419-430.
- PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.) et GARCIA (J.-L.), 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. (Inst. Pasteur)* 128 A : 75-87.
- PICHINOTY (F.), VERON (M.), MANDEL (M.), JOB (C.) et GARCIA (J.-L.), 1978. - Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes* : *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 743-753.
- REDFEARN (M.S.), PALLERONI (N.J.) et STANIER (R.Y.), 1966. - A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 293-313.
- RHODES (M.E.), 1958. - The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. Gen. Microbiol.*, 18 : 639-648.
- RICHARD (D.), 1968. - Techniques rapides de recherche des lysine-décarboxylase, ornithine-décarboxylase et arginine-dihydrolase dans les germes *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Moraxella*. *Ann. Inst. Pasteur*, 114 : 425-430.
- ROLAND (F.), BOURDON (D.) et SZTRUM (S.), 1947. - Différenciation rapide des *Enterobacteriaceae* sans action sur le lactose. *Ann. Institut. Pasteur (Paris)* 73 : 914.
- ROUSSOS (S.), 1977. - Taxonomie et écologie des bactéries sphériques hétérotrophes isolées du milieu marin. Thèse 3^e cycle, Université de Provence, Marseille.
- SIERRA (G.), 1957. - A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between the cells and fatty acid substances. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23 : 15.
- SKERMAN (V.B.D.), 1967. - A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- SNEATH (P.H.A.), 1957. - The application of computers to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 17 : 201-226.
- STANIER (R.Y.), 1976. - Reflexions sur la taxonomie des *Pseudomonas*. *Bull. Inst. Pasteur*, 74 : 255-270.
- STANIER (R.Y.) et ORNSTON (L.N.), 1973. - The β -ketoacid pathway. *Microbial Physiol.*, 9 : 89-224.
- STANIER (R.Y.), PALLERONI (N.J.) et DOUDOROFF (M.), 1966. - The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 159-271.
- TAYLOR (B.F.), CAMPBELL (W.L.) et CHINOY (I.), 1970. - Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultative anaerobic microorganism. *J. Bacteriol.* 102 : 430-437.
- TAYLOR (B.F.) et HEEB (M.J.), 1972. - The anaerobic degradation of aromatic compounds by a denitrifying bacterium. Radioisotope and mutant studies. *Arch. Microbiol.*, 83 : 165-171.
- WILLIAMS (R.J.) et EVANS (W.C.), 1975. - The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Evidence for a reductive pathway. *Biochem. J.*, 148 : 1-10.