

TAXONOMIE NUMÉRIQUE
DE *BACILLUS* THERMOPHILES ISOLÉS
DE SOLS DE RIZIÈRE DE L'AFRIQUE DE L'OUEST

par J. L. Garcia (*), S. Roussos (*), M. Bensoussan, A. Bianchi
et M. Mandel

Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM, Dakar (Sénégal),
et Laboratoire de Microbiologie du Milieu Marin,
Université de Provence, Marseille (France),
et The University of Texas, Cancer System Center,
M. D. Anderson, Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas (USA)

SUMMARY

NUMERICAL TAXONOMY OF A THERMOPHILIC « *BACILLUS* » SPECIES
ISOLATED FROM WEST AFRICAN RICE SOILS

Fifty-seven strains of endospore-forming thermophilic bacteria, 37 of which were capable of denitrification, were isolated from rice soils of West Africa. They were compared with 17 strains of similar bacteria from culture collections, utilizing a total of 123 morphological, physiological and biochemical characteristics. A numerical analysis was performed using the complete linkage-clustering method and the Khi2 test. Seventy-five percent (55 strains) could be included in 12 groups at a taxonomic distance of 0.015. Wild strains of denitrifiers issued in phenons 8 to 12 and strains of phenon 4 (not denitrifying) were related to the named strains of phenons 1 and 7 (*Bacillus stearothermophilus*).

Twenty-two wild strains, and 5 strains from culture collections, were only thermotolerating without growth at 65° C. The strains of phenon 3 were related to the 3 named strains of *B. coagulans*. Phenons 5 and 6 were composed of strains related to *B. circulans*. The strains of phenon 2 denitrified and showed a swollen central endospore; they were closely related to *B. brevis*.

The denitrifying thermophilic strains isolated from rice soils (phenons 8 to 12) were related to the first group (*B. kaustophilus*) of Walker

Manuscrit reçu le 26 août 1981, accepté le 23 mars 1982.

(*) Adresse actuelle : Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Centre de Recherche IRCHA,
BP n° 1, 91710 Vert-le-Petit (France).

ORSTOM.

Fonds Documentaire

N° 2199 a 1

Col B

Date 29 DEC. 1982

and Wolf but their base compositions of DNA were significantly different from those found for the reference strains.

KEY-WORDS: Soil, Thermophily, *Bacillus*, Denitrification, Numerical taxonomy; Rice, Africa.

INTRODUCTION

Au cours d'une analyse de différents groupes bactériens composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal [10], une population hétérogène de 57 souches de bactéries thermophiles sporulées a été isolée ; 65 % de ces souches sont dénitrifiantes. Nous présentons ici une étude détaillée de ces souches en décrivant leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques comparés à ceux obtenus avec 17 souches de collection pouvant servir de référence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Souches isolées du sol.

Les 57 souches ont été isolées de sols de rizière par culture d'enrichissement dans le milieu complexe suivant (d'après Downey [7]) : « Biotrypcase » (Biomérieux, Lyon, France), 10 g ; extrait de levure (Difco), 5 g ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7 mg ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg ; saccharose, 5 g ; KNO_3 ou KNO_2 , 5 g ; eau distillée, 1 000 ml, pH 7,4 (ajusté par l'addition de KOH 40 %). Ce milieu est réparti en ballons de 250 ml à raison de 50 ml par ballon. Après ensemencement, les ballons sont mis en incubation sous vide à 60° C pendant 24 à 48 h. Après un ou deux passages, on procède à des isollements sur « Nutrient agar » (Difco) additionné de 10 g/l d'agar. Les boîtes sont incubées en aérobiose à 60° C pendant 24 h. Après plusieurs étalements successifs, la pureté des cultures est vérifiée. Les souches sont conservées à 4° C en tube incliné sur gélose nutritive renforcée par 10 g/l d'agar.

La majorité des souches proviennent de sols de rizière du Sénégal. Les souches 4, 5, 12, 29 et 58 sont issues de sols de rizière de Mauritanie ; les souches 46 et 47 proviennent de sols de Côte-d'Ivoire et la souche 44 d'un sol de la station de l'IRRI à Los Baños (Philippines).

2) Souches de collection.

Pour compléter l'étude des souches sauvages, 17 souches de collection, représentant trois espèces thermophiles et thermotolérantes du genre *Bacillus*, ont été étudiées (tableau I).

cyt c = cytochrome c.

GC = guanine + cytosine.

TABLEAU I. — Souches de collection utilisées pour l'étude.

N°	Nom	Collection	N° ATCC		Isolement
60	<i>B. thermodenitrificans</i>	DSM 465	—		
61	<i>B. thermodenitrificans</i>	DSM 466	—		
62	<i>B. stearothersophilus</i> subsp. <i>calidolactis</i>	CIP 675	—		Lait
64	<i>B. stearothersophilus</i>	CIP 5280	7954	(R. E. Gordon)	
65	<i>B. stearothersophilus</i>	CIP 5281	7953	(R. E. Gordon)	
66	<i>B. stearothersophilus</i>	CIP 6623	12980	(R. E. Gordon)	
67	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2045	—	—	Sol
68	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2062	12980	(R. E. Gordon)	
69	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2183	12976	(N. R. Smith)	
70	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2184	12977	(N. R. Smith)	
72	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2545	—	—	Zone thermale URSS
73	<i>B. thermodenitrificans</i>	CCM 2565	—	—	Jus betterave sucrière
74	<i>B. thermodenitrificans</i>	CCM 2566	—	—	Jus betterave sucrière
75	<i>B. stearothersophilus</i>	CCM 2620	—	—	Jus betterave sucrière
76	<i>B. coagulans</i>	CIP 5263	10545	(N. R. Smith)	
77	<i>B. coagulans</i>	CIP 5264	8038	(R. E. Gordon)	
78	<i>B. coagulans</i>	CIP 6625	7050	(N. R. Smith)	Lait

DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen (République Fédérale Allemande).

CIP = Collection de l'Institut Pasteur, Paris (France).

CCM = Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno (Tchécoslovaquie).

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md (USA).

3) 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 [25]. La spore de la souche 13 a été observée au microscope électronique.

4) Caractères physiologiques et biochimiques.

La température d'incubation était de 55° C.

L'hydrolyse du Tween 80, la réaction de Voges-Proskauer et le test au rouge de méthyle ont été réalisés par les procédés décrits par Skerman [30], à l'aide du milieu complexe T (Biotrypcase, 10 g; extrait de levure, 5 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg; saccharose, 5 g; NaCl, 9 g; eau distillée, 1 000 ml, pH = 7,4 ajusté par l'addition de KOH 40 %).

Les tests suivants ont été réalisés par les procédés décrits par Gordon et coll. [13], également grâce au milieu T : désamination de la phénylalanine, production de dihydroxyacétone, hydrolyse de l'amidon, réaction au jaune d'œuf, oxydase et catalase, réduction de NO_3^- en NO_2^- , réduction de NO_3^- en gaz.

Sur le milieu T liquide ont été testées en tubes à essai la croissance à différentes températures (4, 30, 40, 50, 55, 65, 70, 75 et 80° C), la tolérance à l'égard de KNO_3 aux concentrations de 5, 10, 20, 30, 40 et 50 g/l et de NaCl aux concentrations de 9, 17, 35, 70 et 105 g/l, la croissance à différents pH (5, 6, 8 et 9). La croissance est appréciée visuellement après 7 jours d'incubation.

La production d'acide à partir des hydrates de carbone en aérobiose (23 sucres : maltose, D-xylose, D-mannitol, fructose, glucose, saccharose, cellobiose, raffinose, D-mannose, D-sorbitol, D-tréhalose, L-rhamnose, D-ribose, L-arabinose, galactose, L-fucose, gluconate, arbutine, L-sorbose, mélezitose, dulcitol, érythritol et glycérol) et en anaérobiose (13 sucres : maltose, glucose, saccharose, lactose,

D-mannose, D-ribose, galactose, D-tréhalose, D-xylose, D-mannitol, cellobiose, L-rhamnose et D-arabinose) a été déterminée par la méthode de Hugh et Leifson [15] sur le milieu T en remplaçant le saccharose par le glucide à tester. La liquéfaction de la gélatine a été recherchée selon la technique de Frazier [8]. L'arginine-dihydrolase, la lysine-décarboxylase et l'ornithine-décarboxylase ont été recherchées selon la technique de Richard [26]. Les tests suivants ont été réalisés par les procédés décrits par Roland et coll. [27] : indole, uréase et tryptophane-désaminase.

On a recherché la prototrophie sur le milieu au citrate de Simmons et sur le milieu synthétique suivant : K_2HPO_4 , 10,5 g ; KH_2PO_4 , 3,5 g ; NH_4Cl , 0,5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 50 mg ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 5 mg ; solution d'oligo-éléments [2], 2 ml ; glucose, 1,5 g ; fructose, 1,5 g ; succinate de sodium, 1,5 g ; pyruvate de sodium, 1,5 g ; citrate de sodium, 1,5 g ; eau distillée, 1 000 ml. On a également testé la croissance sur le milieu synthétique précédent additionné de 1 g/l d'extrait de levure (Difco).

Le temps de génération a été déterminé à 55° C après croissance aérobie sur le milieu T, à l'aide d'un biophotomètre enregistreur de « Bonnet-Maury et Jouan » (Jouan-Quétin, Paris).

L'étude de la dénitrification a été réalisée sur des cultures anaérobies sous hélium, dans le milieu T contenant 5 g/l de KNO_3 , en flacon serum de 125 ml, pendant 48 h à 55° C. Des analyses qualitatives de l'atmosphère des flacons ont été réalisées périodiquement par chromatographie en phase gazeuse [9].

Des activités enzymatiques ont été recherchées après cultures anaérobies à 55° C sur le milieu T renfermant 5 g/l de KNO_3 dans des fioles à vide de 2 l contenant 1,5 l de milieu, selon la méthode décrite par Garcia [11]. Les extraits ont été obtenus dans une cellule de French à 20 000 PSI puis centrifugation à 38 000 g pendant 30 min à 4° C.

Les nitrate-réductases A et B [24] et la nitrite-réductase respiratoire [11] ont été recherchées par des techniques manométriques.

La recherche du cytochrome c a été effectuée dans les extraits à l'aide d'un spectrophotomètre différentiel « Beckman » M25 muni de cuves en quartz de 10 mm ; l'une des cuves contenait l'extrait additionné d'hydrosulfite de sodium.

5) Analyse numérique.

Les caractères sont codés 1 pour positif ou présent et 0 pour négatif ou absent. La matrice finale contient 74 souches et 116 caractères. On a utilisé la méthode d'aggrégation selon le critère de la liaison complète. La distance entre souches et groupes de souches a été calculée selon le critère du Khi_2 ; elle s'exprime en indices taxonomiques. Le programme de calcul est disponible au Laboratoire de Microbiologie du Milieu Marin (Marseille). Le niveau hiérarchique le plus discriminant a été déterminé selon le critère de la *nomenspecies* [6] et la courbe d'entrée des souches dans le dendrogramme [4].

6) Composition en bases de l'ADN.

L'ADN a été extrait des cellules cultivées pendant 12 h à 55° C dans 6 l de milieu complexe T par la méthode de Marmur [19] et purifié grâce à un traitement par le phénol, pour quelques souches caractéristiques des différents phénons ainsi que la plupart des souches de référence. La teneur en guanine + cytosine (GC) a été calculée [28] à partir de la densité de flottaison en $CsCl$ [18].

RÉSULTATS

Les sept caractères suivants ne sont pas discriminants, car négatifs pour toutes les souches examinées : croissance à 4° C, production d'indole, réaction de Voges-Proskauer, présence d'une tryptophane-désaminase,

hydrolyse du Tween 80 et croissance sur milieu au citrate de Simmons ou en présence de NaCl à 10,5 %. Ces caractères ont été exclus de la matrice finale.

1) Regroupement des souches

L'agrégation des souches selon le Khi2 a permis de regrouper 55 souches soit 75 % de l'ensemble des souches testées, en 12 phénons avec un niveau de coupure correspondant à la distance taxonomique 0,015 (fig. 1). L'ensemble des souches se répartit en 4 grands groupes. Le premier (a), qui est le plus éloigné des autres, renferme le phénon 1 qui regroupe 7 souches de collection de *B. stearotherophilus*. Le second (b), lié au troisième par une distance taxonomique de 0,055, regroupe les phénons 2, 3 et 4 ainsi que la majorité des souches non classées dont les souches de référence de *B. coagulans*. Le troisième (c) renferme les phénons 5 et 6 et le phénon 7 qui regroupe 4 souches de référence dont 3 *B. thermodenitrificans*. Le quatrième (d), défini à une distance taxonomique de 0,035, regroupe les phénons 8 à 12.

2) Identification et caractérisation des phénons

Le tableau II reprend les principaux caractères discriminants ; il a été établi pour faciliter le classement éventuel de nouveaux isoléments. Toutes les souches présentent une spore ovale, subterminale à terminale, à paroi épaisse, déformant le sporange (fig. 2 et 3), exceptées les 4 souches du phé-

TABLEAU II. — Principaux caractères discriminants.

	Phénons											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nb de souches	7	4	3	3	8	3	4	3	6	6	3	5
Spore terminale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore paracentrale	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Croissance												
30° C	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
65° C	+	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+
pH 5	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH 8	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	+
NaCl 7 %	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+	+
KNO ₂ 2 %	—	—	—	+	±	+	±	+	+	±	+	+
Hydrolyse de la gélatine	—	+	—	—	+	—	—	—	±	±	—	—
Lysine-décarboxylase	—	+	+	±	±	—	—	—	—	±	—	—
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	+	+	±	—	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ ⁻ → gaz	+	+	±	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Pigment/arbutine	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+
Acide/aérobiose												
Maltose	+	±	—	—	±	—	+	—	—	—	—	—
L-fucose	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arbutine	±	—	—	±	+	+	—	—	—	—	+	—
Acide/anaérobiose												
Saccharose	+	—	±	—	+	+	—	±	±	±	±	—
D-xylose	+	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	—	±	+	+	±	+

+, — et ± représentent respectivement ≥ 80 %, ≤ 25 % et 26-79 % de réponses positives.

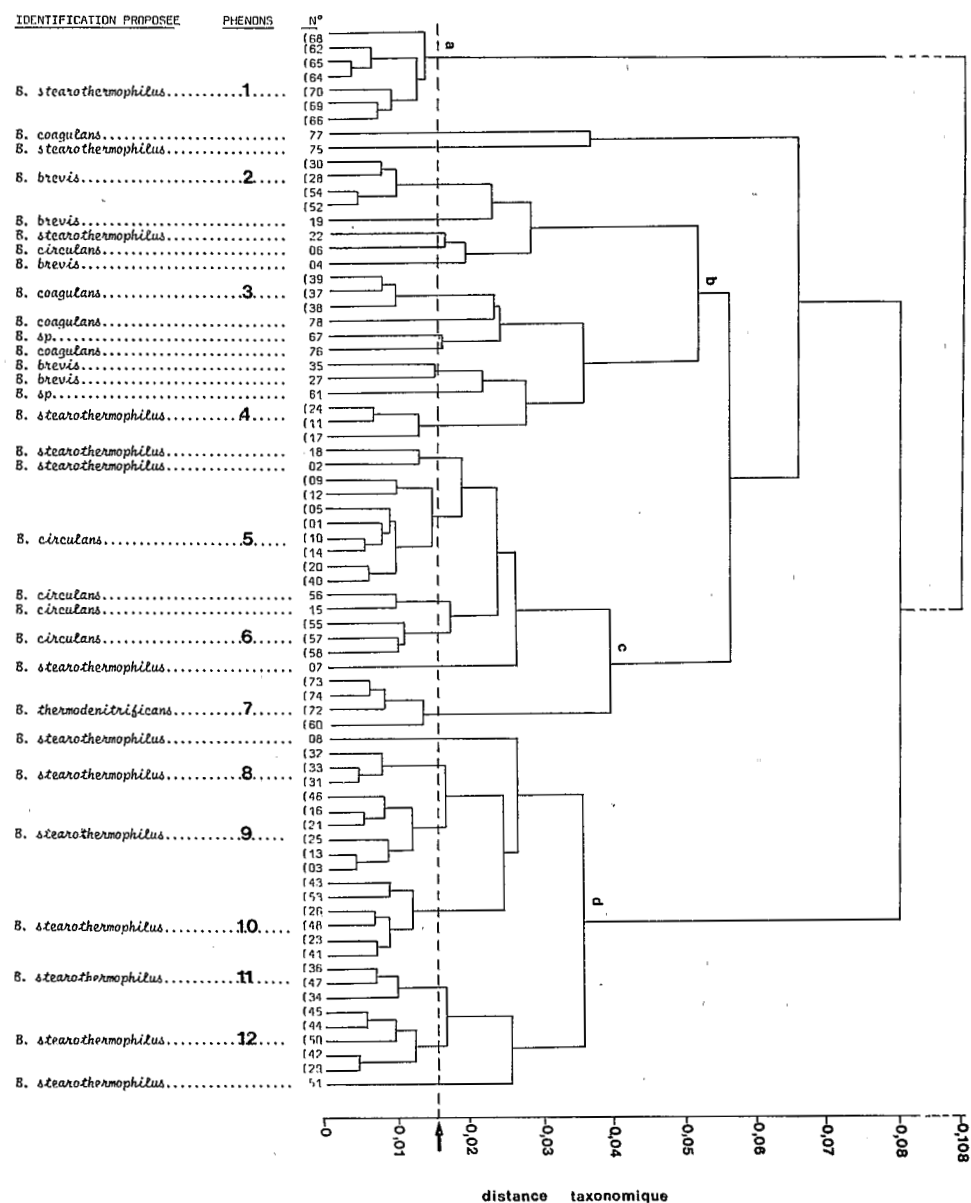


FIG. 1. — Dendrogramme établi selon le critère de la liaison complète et le calcul du Khi2.

FIG. 2. — Clichés au microscope électronique d'une coupe transversale de la souche 13 (phénon 9).

- a) Sporangie et spore en formation ($\times 33\,300$). N = aire nucléaire ; FM = future membrane de la spore ; M = mésosome ; CW = paroi cellulaire.
 b) Sporangie et spore ($\times 33\,300$). OC = enveloppe sporale externe ; C = cœur ; IC = enveloppe sporale interne ; E = exosporium. La barre = $0,66\ \mu\text{m}$.

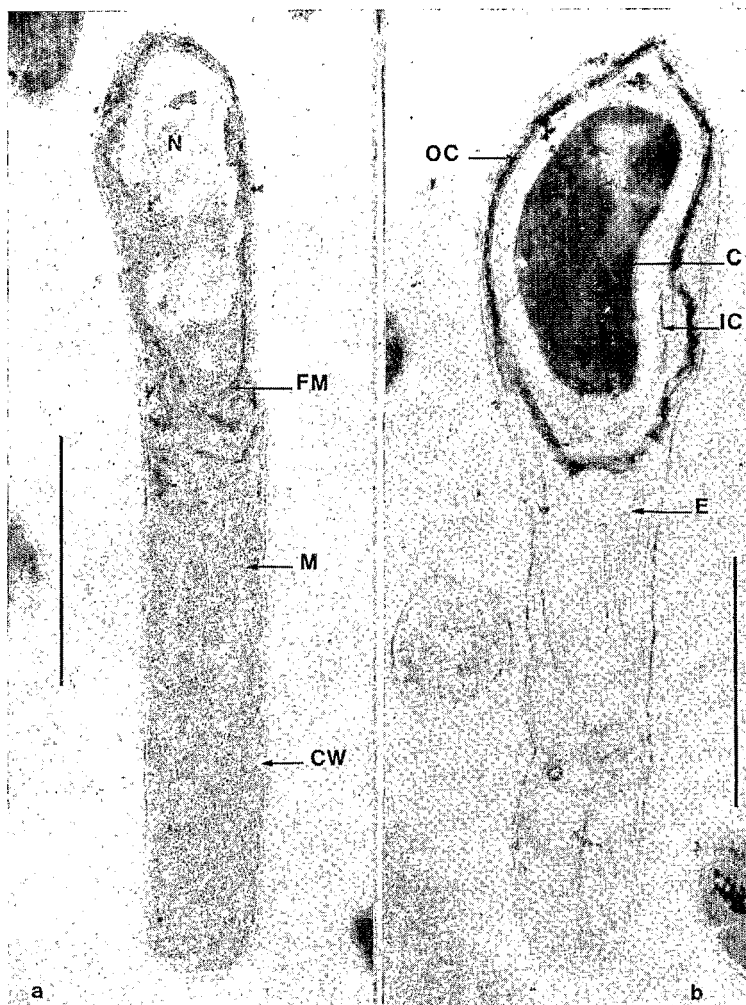


FIG. 2

FIG. 3. — *Clichés au microscope électronique
d'une coupe transversale de la souche 13 (phénon 9).*

- a) Spore ($\times 66\,600$). OC = enveloppe sporale externe ; IC = enveloppe sporale interne ;
C = cœur.
- b) Spore en germination ($\times 60\,000$). SC = enveloppe sporale ; C = cœur. La barre = $0,66\,\mu\text{m}$.

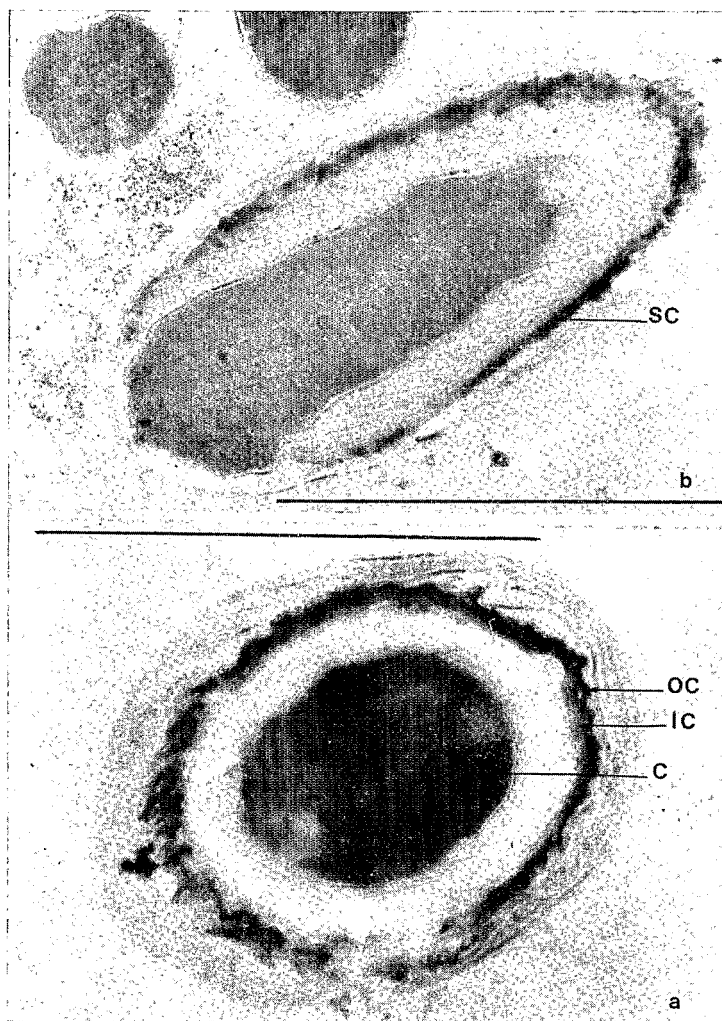


FIG. 3

non 2 qui ont une spore paracentrale. Le Gram est positif ou variable, rarement négatif. Ces bâtonnets sont mobiles pour la plupart ; l'insertion des flagelles est de type péritriche. Presque toutes les souches semblent présenter des exigences complexes en facteurs de croissance. Elles sont toutes oxydase et catalase positives et pourvues d'un métabolisme fermentaire conduisant à une acidification des hydrates de carbone sans production de gaz. Les souches qui réduisent le nitrate possèdent toutes la nitrate-réductase de type A.

a) *Souches thermophiles.*

Selon la 8^e édition de « Bergey's Manual of determinative bacteriology » [5], l'espèce *B. stearothermophilus* regroupe tous les *Bacillus* présentant une croissance à 65° C. Dans notre étude, c'est le cas des phénons 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11 et 12, deux d'entre eux englobant les souches de référence : le phénon 1, celles dénommées *B. stearothermophilus* et le phénon 7, celles dénommées *B. thermodenitrificans*. Selon Wolf et Barker [33], la deuxième espèce, non homologuée par le Manuel de Bergey, est dénitrifiante et constitue une subdivision de la première espèce. En se basant sur cette définition, nous pourrions donc ainsi dénommer les phénons 8, 9, 10, 11 et 12 ; le phénon 4, non dénitrifiant, s'identifierait alors au phénon 1.

Cependant, toutes les souches des phénons 1 et 7 dénitrifient. La distinction effectuée par Wolf et Barker [33] sur ce point ne semble donc pas s'appliquer dans le cas des souches de collection utilisées pour notre étude. Les souches du phénon 7 se distinguent de celles du phénon 1 par une quinzaine de caractères portant principalement sur le métabolisme des hydrates de carbone. En effet, les souches du phénon 7, contrairement à celles du phénon 1, ne produisent pas d'acide en aérobiose sur sorbitol, rhamnose, fucose, arbutine, sorbose, mélezitol, dulcitol et érythritol, et produisent une pigmentation brune sur arbutine. Elles ne fermentent pas le saccharose, le ribose, le xylose, le mannitol, le cellobiose, le rhamnose et l'arabinose. La composition en base de l'ADN (tableau III) varie de 48 à 53 % de GC pour ces deux phénons de souches de référence.

Dans l'ensemble, les souches des phénons 4 et 8 à 12 ne produisent pas ou produisent rarement d'acide à partir des hydrates de carbone en aérobiose, tandis que les souches de référence des phénons 1 et 7 en produisent à partir de nombreux composés, avec une nette prédominance des souches du phénon 1 qui utilisent presque toutes 20 composés sur les 23 testés. L'utilisation des hydrates de carbone en anaérobiose par les souches des phénons thermophiles est variable, avec une prédominance du phénon 1. Les 3 souches du phénon 4 ne réduisent pas le nitrate. Elles hydrolysent l'urée, et deux d'entre elles possèdent la lysine-décarboxylase. Elles tolèrent 7 % de NaCl et 8 % de KNO₃, et croissent à un pH de 6 à 8. Elles produisent de l'acide en aérobiose sur glucose, fructose, mannose et arbutine, et fermentent le maltose, le glucose, le mannose, le tréhalose, le cellobiose et le rhamnose. Le GC % est de 40.

Les 3 souches du phénon 8 possèdent l'ornithine-décarboxylase et tolèrent 7 % de NaCl, 3 % et un pH de KNO₃ de 6 à 8. Elles acidifient en aérobiose

TABLEAU III. — Teneur en GC % de l'ADN de souches représentatives.

N° phénon	N° souche	GC %
1	64	53
1	66	52
1	69	48
1	70	53
2	52	40
3	37	40
4	24	40
5	20	39,3
5	5	38
7	60	52
7	72	50
7	73	50
7	74	52
9	13	43
9	25	40
—	61	40,8
—	67	36
—	78	51

le saccharose et le glycérol, et en anaérobiose le glucose, le saccharose, le tréhalose, le mannitol, le cellobiose, le rhamnose et l'arabinose. Elles ne produisent pas de pigment sur arbutine.

Les 6 souches du phénon 9 tolèrent 7 % de NaCl, 4 % de KNO₂ et un pH de 6 ; 3 souches acidifient le glucose en aérobiose ; la plupart des sucres testés en anaérobiose sont acidifiés exceptés le ribose, le galactose et le xylose. Le GC % est de 40 à 43.

Les 6 souches du phénon 10 n'acidifient pratiquement pas les hydrates de carbone en aérobiose. En anaérobiose, sont acidifiés le maltose, le tréhalose, le mannitol, le cellobiose, le rhamnose et l'arabinose.

Les 3 souches du phénon 11 tolèrent 7 % de NaCl et 3 % de KNO₂. Elles acidifient le glucose, l'arbutine et le glycérol en aérobiose, le maltose, le glucose, le mannitol, le cellobiose, le rhamnose et l'arabinose en anaérobiose.

Les 5 souches du phénon 12 tolèrent 7 % de NaCl, 3 % de KNO₂ et un pH de 8. Certaines d'entre elles produisent de l'acide en aérobiose sur glucose et glycérol, et fermentent le glucose, le tréhalose, le mannitol, le cellobiose et le rhamnose.

Les souches thermophiles décrites dans notre étude peuvent donc être rattachées à l'espèce *B. stearothermophilus*, seule reconnue par le Manuel de Bergey [5].

b) Souches thermotolérantes.

Plusieurs souches, appartenant à 4 phénons, se sont révélées incapables de croître à 65° C. On ne peut donc pas les considérer comme thermophiles au sens strict.

Les quatre souches du phénon 2 présentent une spore déformante paracentrale ; elles hydrolysent la gélatine, possèdent une lysine décarboxylase

et dénitrifiant. La production d'acide à partir des hydrates de carbone est rare (glucose et xylose), et aucune souche ne produit le pigment noir sur arbutine. La production anaérobie d'acide est variable et seuls sont fermentés par toutes les souches le glucose et rhamnose, tandis qu'aucune ne fermente le lactose. Le GC % de l'ADN de la souche 52 est 40. Par la position de la spore et leur activité dénitrifiante, ces souches pourraient être rattachées à l'espèce *B. brevis* [13] car les autres espèces dénitrifiantes connues comme *B. azotoformans* [21] et les *Bacillus* dénitrifiants récemment décrits [22, 23] présentent tous une spore subterminale à terminale.

Les souches du phénon 3 se rapprochent des trois souches de référence de *B. coagulans*. En effet, elles ne croissent pas à 65° C et ne réduisent pas le nitrate ; elles présentent une croissance à pH 5 mais non en présence de 3,5 % de NaCl ni de 2 % de KNO₃. Le métabolisme aérobie des hydrates de carbone est presque négligeable ; seul le glycérol est acidifié. Toutes les souches produisent une pigmentation sur arbutine et présentent un métabolisme fermentaire important ; seul le lactose n'est pas fermenté. Par contre, les trois souches de référence fermentent ce sucre mais non l'arabinose. Le GC % de l'ADN de la souche 37 est de 40 ; il est éloigné de celui de la souche 78 de référence, qui est de 51.

Les huit souches du phénon 5 croissent à pH 8 et réduisent le nitrate en nitrite. Elles hydrolysent la gélatine et, pour une partie d'entre elles, la lécithine et l'amidon. Tous les sucres testés sont fermentés. Le métabolisme aérobie est variable ; seuls sont acidifiés par toutes les souches le fructose et l'arbutine. Ces souches ne peuvent pas être rattachées à *B. stearothermophilus* à cause de leur température de croissance, ni à *B. coagulans* qui ne réduit pas le nitrate et ne croît pas à pH 8 ; elles représentent donc des variants thermotolérants d'un *Bacillus* mésophile qui s'apparenterait à *B. circulans*. Les deux ADN déterminés renferment 38 et 39,3 % de GC (tableau III).

Les trois souches du phénon 6 tolèrent 3,5 % de NaCl et 4 % de KNO₃ ; elles réduisent le nitrate en nitrite. Huit sucres sont acidifiés en aérobiose, mais tous sont fermentés. Ce phénon est très voisin du précédent.

3) Souches non classées

En effectuant la coupure du dendrogramme à la distance taxonomique 0,015, 19 souches, dont 6 de référence, n'ont pas trouvé place dans les 12 phénons précédemment décrits. Parmi celles-ci, 6 souches (les souches nos 2, 7 et 18 non dénitrifiantes et 8, 22 et 51 dénitrifiantes) sont thermophiles et ne croissent pas à pH 5 ; ce sont donc des souches de *B. stearothermophilus*. Cependant, la souche 51 est la seule à croître à 80° C ; elle est située à l'extrémité droite de notre dendrogramme (fig. 1). Il pourrait s'agir d'une souche dénitrifiante de *B. caldotenax* [29].

Les autres souches, disséminées entre les phénons 2 et 4 et 5 et 6, ne croissent ni à 65° C, ni à pH 5. Ce sont donc probablement des variants thermotolérants de *Bacillus* mésophiles, soit *B. circulans* (souches 6, 15 et 56) soit *B. brevis* (souches 4, 19, 27 et 35).

Notre étude confirme le résultat antérieurement acquis pour la souche de référence 61 de la collection de Göttingen [21].

DISCUSSION

Si l'on considère la croissance à 65° C comme seul critère démarquant les bactéries thermophiles, seuls les phénons 1, 4 et 7 à 12 de notre étude entrent donc dans cette catégorie. Depuis la première description par Ambroz [1] d'une bactérie sporulée thermophile, de très nombreuses souches thermophiles ont été décrites [3, 12, 13, 14, 16, 20, 29, 31, 32]. Malgré tout, le Manuel de Bergey ne reconnaît qu'une seule espèce sporulée thermophile, très hétérogène et aux limites incertaines, *B. stearothermophilus*, qui englobe toutes les souches décrites jusqu'à présent. Sa définition est imprécise en raison de la grande variabilité de ses caractères.

Walker et Wolf [32] ont scindé cette espèce en 3 groupes. Le groupe 1 dénommé *B. kaustophilus* dénitrifie, fermente le glucose et le maltose mais non le lactose. Cette définition correspond sensiblement aux phénons thermophiles de notre étude ; mais le phénon 1, qui regroupe des souches de référence, fermente le lactose. Le groupe 2 ne réduit pas le nitrate, n'hydrolyse ni l'amidon, ni la gélatine, croît en présence de NaCl à 3 % et fermente le glucose, le mannitol, le saccharose, le maltose, le xylose, le rhamnose et le cellobiose ; le phénon 4 de notre étude est voisin de ce groupe mais il ne fermente pas le mannitol, le saccharose et le xylose. Le groupe 3 réduit le nitrate en nitrite ; le sous-groupe 3a fermente le lactose mais non l'arabinose comme le phénon 1 de notre étude ; cependant, l'hydrolyse de l'amidon et de la gélatine, positive pour le sous-groupe 3a, est négative pour le phénon 1.

Dans une récente mise au point de la taxonomie des *Bacillus* thermophiles, Wolf et Sharp [35], reprenant toutes les études antérieures, ont confirmé cette classification en trois groupes.

L'espèce *B. coagulans* présente également, selon le Manuel de Bergey, des variations morphologiques considérables et des exigences nutritionnelles diverses. Elle croît à pH 5,0 mais non à 65° C. Cependant, Wolf et Barker [32] pensent qu'il existe une variante qui croît à 65° C et à pH 6,2. *B. coagulans* se distingue nettement de *B. stearothermophilus* par la température et le pH de croissance, et réduit très rarement le nitrate [13]. Le phénon 3 de notre étude correspond sensiblement au groupe 4 de Klaushofer et Hollaus [16] ainsi qu'aux descriptions de Gordon et coll. [13] et Lemille et coll. [17].

Au cours de diverses études relatives aux espèces thermophiles du genre *Bacillus*, de nombreuses espèces mésophiles croissant à des températures inhabituellement élevées, ont été reconnues. Walker et Wolf [32] citent une liste de 7 espèces comprenant *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. circulans* et *B. licheniformis*. Golovacheva et coll. [12] ont reconnu plusieurs de ces espèces ainsi que *B. lentus*. Klaushofer et Hollaus [16] ont identifié le groupe 1 de leur étude à *B. sphaericus*. Harris et Fields [14] ont décelé 11 variants thermophiles d'espèces mésophiles

lors d'une étude de 33 souches thermophiles. Wolf et Chowdhury [34], dans une étude détaillée de l'espèce *B. circulans*, ont décrit un sous-groupe 1a dont 5 souches sont capables de croître à 55° C. La description de ce groupe est voisine de celle des phénons 5 et 6 de notre étude.

Dans les études antérieures sur la taxonomie des *Bacillus* thermophiles, les analyses de l'ADN sont rares. Harris et Fields [14] ont cependant relié leur étude de 33 souches thermophiles isolées de sols et d'eaux à une détermination complète de la teneur en GC de l'ADN de ces souches. Leur premier groupe de 10 souches a été apparenté à *B. coagulans* avec, cependant, un GC % plus bas (38,8 à 42,9). La souche 37 de notre phénon 3 attribué à la même espèce a un GC % de 40 ; mais la souche 78 de référence a un GC % de 51 nettement plus élevé.

Le troisième groupe de l'étude de Harris et Fields [14] est assimilé à l'espèce *B. stearothersophilus* avec un GC % de 52 à 53,1. Les souches de références de nos phénons 1 et 7 ont présenté un GC % de 48 à 53. Par contre, les souches de nos phénons de souches sauvages thermophiles présentent une teneur en GC de l'ADN moins élevée (40 à 43 %). Elles semblent se rapprocher des souches du deuxième groupe de l'étude de Harris et Fields [14] qui présentaient un GC % de 40,8 à 43,9 et qu'ils n'ont pas voulu rattacher à *B. stearothersophilus* en raison de leur GC % plus bas.

La taxonomie numérique basée sur l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, se révèle donc un outil appréciable pour l'identification des *Bacillus* thermophiles. Mais d'autres techniques ont également été employées pour tenter d'approfondir la connaissance de ces souches [29, 35] : réactions d'agglutination avec des immunsérums de spores ou des antigènes « O » de cellules végétatives, analyse électrophorétique des estérases, analyse des lipides polaires, sensibilité aux antibiotiques ou à divers bactériophages, hybridation d'ADN et tests API-ZYM.

Les résultats obtenus au cours de ces diverses analyses semblent confirmer la classification de Walker et Wolf [32] en trois groupes distincts. Les souches dénitrifiantes isolées des sols de rizière appartiennent donc au premier groupe dont le type est *B. kaustophilus* [35], mais elles semblent cependant se démarquer des souches de référence par leur GC % plus bas.

RÉSUMÉ

Isolées de sols de rizière de l'Afrique de l'Ouest, 57 souches de bactéries sporulées thermophiles dont 37 souches dénitrifiantes ont été étudiées sur la base de 123 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques et comparées à 17 souches de référence. Les résultats ont été soumis à une analyse de taxonomie numérique au moyen de la méthode d'agrégation selon le critère de la liaison complète. La distance entre souches a été calculée selon le critère du K_{hi2} qui a permis de regrouper 55 souches, soit 75 % de l'ensemble des souches testées, en 12 phénons définis par une distance taxonomique de 0,015.

Les souches des phénons 8 à 12 toutes dénitrifiantes et celles du phénon 4

non dénitrifiantes, ont été reliées aux souches de référence regroupées dans les phénons 1 et 7 ; elles représentent l'espèce *B. stearothermophilus*. Vingt-sept souches thermotolérantes n'ont pas présenté de croissance à 65° C. Parmi elles, les souches du phénon 3 ont été apparentées à *B. coagulans* ; les phénons 5 et 6 regroupent des souches voisines de *B. circulans* ; les souches du phénon 2 qui présentent une spore paracentrale déformante et qui dénitrifient, sont proches de *B. brevis*.

Les souches thermophiles dénitrifiantes isolées des sols de rizière se rattachent au groupe 1 (*B. kaustophilus*) de Walker et Wolf mais semblent se démarquer des souches de référence par leur GC % plus bas.

MOTS-CLÉS : Sol, *Bacillus*, Thermophilie, Dénitrification, Taxonomie numérique ; Rizière, Afrique.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre reconnaissance au Dr F. Pichinoty (Laboratoire de Biochimie Végétale, UER de Luminy, Marseille, France) pour l'envoi de souches de collection et l'intérêt qu'il a manifesté pour le présent travail. Nous remercions vivement le Dr M. Kocur (Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, Tchécoslovaquie) pour son aimable envoi de souches de collection. Nous remercions également le Dr C. Chauve et le Dr X. Mattéi (Laboratoire de Microscopie Électronique et de Biologie Animale, Université de Dakar, Sénégal) qui ont réalisé les prises de vue au microscope électronique. L'aide technique apportée par MM T. Badji et O. Camara a été grandement appréciée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMBROZ, A., *Denitrobacterium thermophilum spec. nova*, ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. *Centr. Bakt. Parasitenk.*, 1913, (II abt.), 37, 3-16.
- [2] AUGIER, J., A propos de la numération des *Azotobacter* en milieu liquide. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91, 759-765.
- [3] de BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai de classification biochimique de 64 *Bacillus* des groupes II et III représentant 11 espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, 122, 463-473.
- [4] BIANCHI, M., Étude de vibrions de haute mer et de leurs homologues non marins : biochimie, nutrition et taxonomie numérique. *Arch. Mikrobiol.*, 1971, 77, 127-139.
- [5] BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E., *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, (Eight). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [6] DELABRE, M., BIANCHI, A. & VÉRON, M., Étude critique de méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification de bactéries aquicoles. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1973, 124 A, 489-506.
- [7] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, 91, 634-641.
- [8] FRAZIER, W. C., A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. infect. Dis.*, 1926, 39, 302-309.
- [9] GARCIA, J. L., Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 79-84.

- [10] GARCIA, J. L., Analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1977, 128 A, 443-446.
- [11] GARCIA, J. L., Étude de la dénitrification chez une bactérie thermophile sporulée. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1977, 128 A, 447-458.
- [12] GOLOCHEVA, R. S., EGORAVA, L. A. & LOGINOVA, L. G., Ecology and systematics of aerobic obligate-thermophilic bacteria isolated from thermal localities on Mount Yangan-Tan and Kunashir Ile of the Kuril chain. *Mikrobiologiya*, 1965, 34, 693-698.
- [13] GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & HOR-NAY PANG, The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook n° 427, U. S. Department of Agriculture, Washington, 1973.
- [14] HARRIS, O. & FIELDS, M. L., A study of thermophilic aerobic spore-forming bacteria isolated from soil and water. *Canad. J. Microbiol.*, 1972, 18, 917-923.
- [15] HUGH, R. & LEIFSON, E., The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 1953, 66, 24-26.
- [16] KLAUSHOFER, H. & HOLLAUS, F., Zur Taxonomie der Hochthermophilen, in Zuckerfabrikssäften vorkommenden aeroben Sporenbildner. *Z. Zuckerind.*, 1970, 20, 465-470.
- [17] LEMILLE, F., de BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe 1, appartenant à 9 espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, 116, 808-819.
- [18] MANDEL, M., SCHILDKRAUT, C. L. & MARMUR, J., Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine (S. P. Colowick & N. O. Kaplan), 128, (p. 184-195), Academic Press, New York, London, 1968.
- [19] MARMUR, J., A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. mol. Biol.*, 1961, 3, 208-218.
- [20] MARSH, C. L. & LARSEN, D. L., Characterization of some thermophilic bacteria from hot springs of Yellowstone National Park. *J. Bact.*, 1953, 65, 193-197.
- [21] PICHINOTY, F., DURAND, M., JOB, C., MANDEL, M. & GARCIA, J. L., Étude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*. *Canad. J. Microbiol.*, 1978, 24, 608-617.
- [22] PICHINOTY, F., GARCIA, J. L. & MANDEL, M., Taxonomie numérique de 46 souches dénitrifiantes et mésophiles de *Bacillus* isolées à partir du sol par culture élective en présence de nitrite. *Canad. J. Microbiol.*, 1980, 26, 787-795.
- [23] PICHINOTY, F., MANDEL, M. & GARCIA, J. L., The properties of novel mesophilic denitrifying *Bacillus* cultures found in tropical soils. *J. Gen. Microbiol.*, 1979, 115, 419-430.
- [24] PICHINOTY, F. & PIECHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 77-98.
- [25] RHODES, M. E., The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silverplating staining method. *J. gen. Microbiol.*, 1958, 18, 639-648.
- [26] RICHARD, D., Techniques rapides de recherche des lysine-décarboxylase ornithine-décarboxylase et arginine-dihydrolase dans les germes *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Moraxella*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, 114, 425-430.
- [27] ROLAND, F., BOURDON, D. & SZTUM, S., Différenciation rapide des entérobactériacés sans action sur le lactose. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 914-916.
- [28] SCHILDKRAUT, C. L., MARMUR, J. & DOTY, P., Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J. mol. Biol.*, 1962, 4, 430-433.

- [29] SHARP, R. J., BOWN, K. J. & ATKINSON, A., Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of *Bacillus*. *J. gen. Microbiol.*, 1980, 117, 201-210.
- [30] SKERMAN, V. B. D., A guide to the identification of the genera of bacteria, Williams and Wilkin Co., Baltimore, 1967.
- [31] SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E., Aerobic spore-forming bacteria, Monograph n° 16, U. S. Department of Agriculture, Washington, 1952.
- [32] WALKER, P. D. & WOLF, J., The taxonomy of *Bacillus stearothermophilus*, in « Spore Research » (A. N. Barker, G. W. Gould & J. Wolf), (p. 247-264), Academic Press, New York, London, 1971.
- [33] WOLF, J. & BARKER, A. N., The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species, in « Identification methods for microbiologists ». (B. M. Gibbs & D. A. Shapton), (p. 93-109), Academic Press, New York, London, 1968.
- [34] WOLF, J. & CHOWDHURY, M. S. U., The *Bacillus circulans* complex: biochemical and immunological studies, in « Spore Research » (A. N. Barker, G. W. Gould & J. Wolf), (p. 227-245), Academic Press, New York, London, 1971.
- [35] WOLF, J. & SHARP, R. J., Taxonomic and related aspects of thermophiles within the genus *Bacillus*, in « The aerobic endospore-forming bacteria » (R. C. W. Berkeley & M. Goodfellow), (p. 251-296), Academic Press, New York, London, 1981.