



Taxonomie numérique de 46 souches dénitrifiantes et mésophiles de *Bacillus* isolées à partir du sol par culture élective en présence de nitrite

F. PICHINOTY ET J.-L. GARCIA

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

ET

M. MANDEL

The University of Texas, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, TX, U.S.A.

Approuvé le 3 avril 1980

PICHINOTY, F., J.-L. GARCIA et M. MANDEL. 1980. Taxonomie numérique de 46 souches dénitrifiantes et mésophiles de *Bacillus* isolées à partir du sol par culture élective en présence de nitrite. *Can. J. Microbiol.* 26: 787-795.

Trente et une souches dénitrifiantes de *Bacillus* ont été isolées à partir de sols d'origines variées par culture d'enrichissement, à 32°C, en anaérobiose et en milieu peptoné contenant du nitrite. Une souche a été isolée en présence d'oxyde nitrique comme seul accepteur terminal d'électrons. Elles appartiennent toutes au second groupe morphologique du genre *Bacillus*. Elles dénitrifient NO₃⁻ et NO₂⁻, sont mésophiles, auxotrophes et oxydase-positives. Quinze souches, isolées à partir de sols tropicaux dans les mêmes conditions, avaient déjà été décrites. La taxonomie numérique de ces 47 souches a été réalisée sur la base de 108 caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Elle révèle une grande hétérogénéité. Par contre la composition en bases de l'ADN varie peu d'une souche à l'autre: la valeur moyenne du pourcentage en guanine + cytosine est de 40.5 ± 1.1. Deux souches sont apparentées à *Bacillus azotoformans*. Les autres souches se différencient nettement de cette espèce ainsi que de *B. brevis*. Ce travail n'autorise aucune conclusion taxonomique définitive. Il présente un intérêt écologique puisque ces bactéries semblent ubiquitaires dans les sols de régions tempérées et dans les sols tropicaux.

PICHINOTY, F., J.-L. GARCIA, and M. MANDEL. 1980. Taxonomie numérique de 46 souches dénitrifiantes et mésophiles de *Bacillus* isolées à partir du sol par culture élective en présence de nitrite. *Can. J. Microbiol.* 26: 787-795.

Thirty-one denitrifying strains of *Bacillus* were isolated from soils of diverse origin by anaerobic enrichment culture at 32°C in peptone medium containing nitrite. One strain was isolated when nitric oxide was provided as the sole terminal acceptor of electrons. All 32 belong to the second morphological group of the genus *Bacillus*. They denitrify NO₃⁻ and NO₂⁻, are mesophilic, auxotrophic, and oxidase-positive. The numerical taxonomy of these 32 strains plus that of 15 strains isolated previously under the same conditions from tropical soils was done on the basis of 108 morphological, physiological, and biochemical characters. It reveals great heterogeneity. The DNA base composition, on the other hand, varies little from one strain to the other: the mean percentage of guanine + cytosine is 40.5 ± 1.1. Two strains are related to *Bacillus azotoformans*. The other strains are clearly distinct from that species as well as from *B. brevis*. These results do not allow us to draw any final taxonomic conclusion. They are of some ecological interest because such bacteria seem to be ubiquitous in both temperate and tropical soils.

Introduction

Quinze souches dénitrifiantes de *Bacillus*, isolées à partir de sols du Sénégal par culture d'enrichissement, à 32°C, en anaérobiose et en milieu peptoné contenant 0.5% de KNO₂, ont été décrites (Pichinoty et al. 1979). Bien que la teneur en guanine + cytosine (G + C) de leur ADN varie très peu, elles constituent un ensemble phénotypiquement hétérogène. Du point de vue taxonomique, elles appartiennent au second groupe morphologique du genre *Bacillus* mais se différencient nettement de l'espèce dénitrifiante *B. azotoformans* (Pichinoty et al. 1978). Trente-deux nouvelles souches ont été isolées à partir de sols prove-

nant de régions tropicales et tempérées. Elles sont décrites dans le présent article. La taxonomie numérique des 47 souches a été réalisée.

Matériel et méthodes

Souches de collection

Les souches 1 et 2 de *B. azotoformans* ont été isolées par culture d'enrichissement en présence de N₂O (Pichinoty et al. 1978). Les souches 5122 et 5286 de *B. brevis* proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur.

Isolement

Lors de l'ensemencement les sols ont été paillés pendant 10 min à 80°C. La souche RS19 a été isolée sous une atmosphère contenant 10% de NO et 90% de N₂ en milieu de culture élective en présence de nitrite: les 31 autres souches ont été isolées en présence de NO₂ (Pichinoty et al. 1979).

ORSTOM.
Fond
N° 1736
Cote B
Date

TABLEAU 1. Températures maximales de croissance, concentrations maximales de nitrite tolérées, teneurs de l'ADN en guanine + cytosine (G + C) exprimées en moles pour cent, numéros d'inscription à la Collection de l'Institut Pasteur et pH du milieu d'isolement

Souche	Temp. maximale, °C	[NO ₂ ⁻], mM	G + C	Numéros d'inscription à la CIP	pH
SM1	42	411	40	R932	7
SM2	44	411	40	R933	7
SM3	46	411	39	R934	7
SM4	36	176	40	R935	7
SM5	49	411	43	R936	7
SM6	41	294	41	R937	7
SM7	39	294	40	R938	7
SM8	40	176	40.8	R940	7
SM9	36	235	40.3	R941	7
SM10	40	411	39	R942	7
SM11	42	411	40	R943	7
SM12	40	117	42.9	R944	7
SM13	41	176	42	R945	7
SM14	40	117	42	R946	7
SM15	40	117	42	R947	7
SM16	40	59	40	R948	7
SE2	46	411	39	R979	7
SE3	44	411	40	R980	8
SE4	43	411	40	R981	8
SV3	40	59	43	R983	7
SV4	44	411	41	R984	8
SV6	48	411	39	R985	7
SV7	40	176	39.8	R986	7
SV8	42	353	41.3	R987	7
SV9	44	411	39.3	R988	7
SG1	40	411	38.3	R982	8
RS17	44	411	40	R989	8
RS19	47	411	41	R990	8
RS20	41	411	39	R991	8
RS22	48	353	41	R992	8
RS24	41	176	40	R993	8
RS25	48	411	42	R994	8
1	45	59	39	R925	7
2	45	117	39.3	66-75	7
5122	55	117	44.9	51.22	
5286	45	117	48	52.86	

habituellement neutre; cependant quelques souches ont été isolées à pH 8 (tableau 1). Chaque souche porte un indicatif précisant l'origine du sol qui a servi à son isolement: SM, Marseille; SE, Espagne; RS, Sénégal; SV, Venezuela; SG, Guadeloupe. Les souches sont conservées à l'état lyophilisé par la Collection de l'Institut Pasteur; leurs numéros d'inscription figurent dans le tableau 1.

Méthodes d'identification

La composition des différents milieux de culture et les méthodes utilisées pour la caractérisation ont déjà été mentionnées (Gordon *et al.* 1973; Pichinoty *et al.* 1979; Skerman 1967).

Taxonomie numérique

Les 108 caractères suivants ont été retenus.

Caractères morphologiques

1, colonies translucides; 2, colonies opaques et petites (diamètre inférieur à 4 mm); 3, colonies opaques et grandes (diamètre compris entre 4 et 8 mm); 4, colonies s'étalant sur la

surface; 5, Gram-variable; 6, Gram-négatif; 7, diamètre de la cellule compris entre 0.3 et 0.4 µm; 8, diamètre de la cellule compris entre 0.5 et 0.6 µm; 9, présence d'endospores; 10, mobilité et présence de flagelles; 11, production d'un pigment caroténoïde jaune.

Caractères physiologiques

12, croît entre 36 et 40°C; 13, croît entre 41 et 45°C; 14, croît entre 46 et 50°C; 15, croît entre 51 et 55°C; 16, tolère une concentration de NO₂⁻ comprise entre 60 et 200 mM; 17, tolère une concentration de NO₂⁻ comprise entre 200 et 400 mM; 18, réaction à l'oxydase; 19, cytochrome c; 20, croissance, en anaérobiose, en présence de NO₃⁻; 21, croissance, en anaérobiose, en présence de NO₂⁻; 22, croissance, en anaérobiose, en présence de NO; 23, croissance, en anaérobiose, en présence de N₂O; 24, croissance, en anaérobiose, en présence de S₄O₆²⁻; 25, croissance, en anaérobiose, en présence de fumarate; 26, fermentation anaérobie du glucose; 27, croissance en présence de NaN₃ à 0.02%; 28, croissance à pH 5.6; 29, croissance en présence de lysozyme à 0.001%; 30, croissance en présence de

NaCl à 5%; 31, croissance en présence de KNO_3 à 8%; 32, production de poly- β -hydroxybutyrate; 33, production de N_2 en milieu contenant NO_3^- ; 34, production d'un pigment brun en milieu contenant de la L-tyrosine; 35, production d'acide benzoïque en milieu contenant de l'hippurate; 36, production d'indole; 37, réaction de Voges-Proskauer; 38, réaction au jaune d'oeuf.

Recherche d'enzymes

39, catalase; 40, hydrolyse de la gélatine; 41, hydrolyse de l'amidon; 42, hydrolyse du "Tween 80"; 43, uréase; 44, L-phénylalanine-désaminase; 45, arginine-dihydrolase; 46, β -galactosidase; 47, L-glutamate-déshydrogénase; 48, L-alanine-déshydrogénase; 49, L-leucine-déshydrogénase; 50, nitrate-réductase A; 51, nitrate-réductase B ou nitrate-réductase non identifiée; 52, nitrite-réductase respiratoire.

Utilisation des acides organiques

53, acétate; 54, propionate; 55, butyrate; 56, isobutyrate; 57, valérate; 58, isovalérate; 59, malonate; 60, succinate; 61, glutarate; 62, fumarate; 63, pyruvate; 64, α -cétoglutarate; 65, glycolate; 66, DL-lactate; 67, L-malate; 68, DL-3-hydroxybutyrate; 69, tartrate (mélange des trois stéréoisomères); 70, citrate; 71, glycine; 72, α -L-alanine; 73, DL-aspartate; 74, asparagine; 75, L-glutamate; 76, glutamine.

Production d'acide à partir des hydrates de carbone

77, D-glucose; 78, D-fructose; 79, D-galactose; 80, D-mannose; 81, L-rhamnose; 82, L-fucose; 83, D-fucose; 84, L-sorbose; 85, méthyl α -D-glucoside; 86, D-gluconate; 87, D-xylose; 88, D-ribose; 89, L-arabinose; 90, D-arabinose; 91, maltose; 92, D-cellobiose; 93, lactose; 94, D-tréhalose; 95, D-mélibiose; 96, saccharose; 97, D-raffinose; 98, D-mélézitose; 99, arbutine; 100, esculine; 101, D-salicine; 102, D-sorbitol; 103, D-mannitol; 104, dulcitol; 105, L-arabitol; 106, D-arabitol; 107, méso-érythritol; 108, glycérol.

Les caractères étudiés ont produit, pour chaque souche, 108 résultats codés de façon binaire (1 = présent ou positif; 0 = absent ou négatif). Les caractères 12, 16, 18, 19 et 49 sont toujours positifs. L'indice de similitude a été calculé d'après le coefficient de Sokal-Michener et le regroupement des souches a été effectué par la méthode de la liaison simple (Sneath et Sokal 1973).

Résultats

Morphologie

Les colonies des souches SM7, SV7 et RS24 sont opaques et petites; les colonies des souches SM6, SM8, RS22 et RS25 sont opaques et grandes; les colonies des souches SM3, SE2 et SV6 s'étalent largement sur la surface de la gélose en formant un film uniforme. Les colonies des autres souches sont translucides.

Les cellules ont l'aspect de bâtonnets présentant une longueur variable et des extrémités arrondies. Les cellules des souches SM3, SM8, SM9, SE2, SV6, RS22 et RS24 ont un diamètre compris entre 0.5 et 0.6 μm . Les cellules des autres souches ont un diamètre compris entre 0.3 et 0.4 μm . Ces bactéries sont généralement à Gram-variable. Cependant les souches SM4, SM7 et SV7 sont à Gram-négatif. Les endospores sont ovales (0.5–1.0 $\mu\text{m} \times$ 0.8–1.5 μm) et déforment nettement le sporange. Quatre souches sont asporogènes (tableau 2). Il n'a jamais été observé de capsule.

Trois souches ne sont pas mobiles (tableau 2). Les souches mobiles possèdent des flagelles péritriches généralement peu nombreux. Il est parfois difficile d'observer leur mobilité. Les cultures en milieu liquide sont homogènes et ne présentent pas de voile à leur surface.

Caractères physiologiques et biochimiques

Les 32 souches sont auxotrophes. Elles dénitrifient NO_3^- et NO_2^- avec production de N_2 , donnent une réponse positive au test à l'oxydase, ont un cytochrome de type *c* et la L-leucine-déshydrogénase. La température maximale de croissance et la concentration maximale de nitrite tolérée par chaque souche sont indiquées dans le tableau 1. Les caractères suivants sont toujours négatifs: croissance, en anaérobiose, en présence de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; production d'un pigment noir ou brun en milieu glucosé; production de dihydroxyacétone à partir du glycérol; synthèse d'un pigment caroténoïde; production de H_2 par fermentation du glucose; hydrolyse de la tyrosine et réaction au jaune d'oeuf. La nitrite-réductase respiratoire n'a pas été trouvée chez la souche SG1. Divers caractères variables figurent dans le tableau 2. Les sept souches pourvues d'un pouvoir fermentaire croissent lentement aux dépens du glucose en anaérobiose et acidifient légèrement le milieu. Aucune souche ne produit de l'acide à partir du dulcitol, de l'esculine, du L-sorbose ou du D-fucose. Les résultats concernant la production d'acide à partir des hydrates de carbone figurent dans le tableau 3. Les résultats concernant l'utilisation des acides organiques figurent dans le tableau 4. Aucune souche ne dégrade le malonate.

Génotype

Les teneurs en guanine plus cytosine de l'ADN des 32 souches figurent dans le tableau 1. Chez les 47 souches la valeur moyenne est de 40.5 mol% \pm 1.1.

Taxonomie numérique

Le dendrogramme (fig. 1) traduit une grande hétérogénéité. La classe X comprend 27 souches qui sont toutes dénuées d'activité fermentaire. Elle est constituée de la sous-classe 1 comprenant 21 souches, du groupe C de 4 souches et de 2 souches isolées SGI et RS15. Toutes les souches appartenant à la sous-classe 1 dénitrifient NO_3^- , NO_2^- et N_2O , n'hydrolysent pas la gélatine ni l'amidon, ont la nitrate-réductase A et la nitrite réductase respiratoire; ne produisent pas d'acide à partir du glucose et utilisent l'acétate, le fumarate, le pyruvate, le L-malate et le L-glutamate. La sous-classe 1 renferme le groupe A de 9 souches et le groupe B de 12 souches. Le groupe A est à son tour subdivisé en

TABLEAU 2. Caractères classiques variables

Caractères	No. de souches positives	Souches négatives
Mobilité et présence de flagelles	33	SM5, SV3, RS19
Présence d'endospores	32	SM15, SV4, SV7, RS17
Catalase	25	SM3, SM4, SM7, SM15, SM16, SE2, SV6, SV8, RS24, 1, 2
Croissance aux dépens de NO_3^-	34	5122, 5286
Croissance aux dépens de NO_2^-	34	5122, 5286
Croissance aux dépens de N_2O	31	SV8, SG1, RS20, 5122, 5286
Croissance aux dépens de NO	3	Toutes excepté SM12, SM13 et SM14
Croissance aux dépens de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	15	Toutes excepté SM1, SM4, SM10, SE3, SE4, SV4, SV8, SV9, RS17, RS19, RS22, RS24, RS25, 1 et 2
Croissance aux dépens du fumarate	6	Toutes excepté SM4, SM7, SM10, SM11, 1 et 2
Production de N_2 en milieu contenant NO_3^-	34	5122, 5286
Fermentation du glucose	7	Toutes excepté SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV4 et SV8
Croissance en présence de NaCl à 5%	15	Toutes excepté SM1, SM2, SM5, SM6, SM10, SM11, SE2, SE3, SE4, SV6, SV9, RS17, RS19, RS20 et RS22
Croissance en présence de KNO_3 à 8%	22	SM4, SM7, SM8, SE2, SV3, SV4, SV6, SV7, SG1, RS25, 1, 2, 5122, 5286
Croissance à pH 5.6	4	Toutes excepté SV3, RS19, RS22 et RS25
Croissance en présence de NaN_3 à 0.02%	1	Toutes excepté SV6
Résistance au lysozyme	3	Toutes excepté SM7, SM15 et SV9
Production d'indole	1	Toutes excepté SM8
Décomposition de l'hippurate	15	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM10, SV3, SV4, SV7, SV8, SV9, RS19, RS20, RS22, RS24, RS25 et 5122
Production de poly- β -hydroxybutyrate	9	Toutes excepté SM3, SM4, SM6, SM7, SM8, SE2, RS24, 1 et 2
Réaction de Voges-Proskauer	1	Toutes excepté SM15
Production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine	4	Toutes excepté SM2, SE3, SV9 et RS17
Nitrate-réductase A	16	Toutes excepté SM1, SM2, SM3, SM4, SM5, SM6, SM7, SM8, SM10, SE2, SV6, SV7, SG1, RS24, 1 et 2
Nitrate-réductase non identifiée	20	Toutes excepté SM9, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SE3, SE4, SV3, SV4, SV8, SV9, RS17, RS19, RS20, RS22, RS25, 5122 et 5286
Nitrite-réductase respiratoire	34	SG1, 5122
Hydrolyse de la gélatine	9	Toutes excepté SM5, SV4, SV8, RS19, RS20, RS22, RS25, 5122 et 5286
Amylase	3	Toutes excepté RS19, RS22 et RS25
Hydrolyse du "Tweën 80"	19	SM1, SM2, SM3, SM4, SM6, SM7, SM8, SM9, SM10, SE3, SE4, SV4, SV7, SV8, 1, 2, 5122
Uréase	16	Toutes excepté SM1, SM5, SM6, SM8, SM12, SE3, SE4, SV3, SV8, SV9, RS17, RS19, RS20, RS22, RS24 et RS25
β -Galactosidase	14	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SE2, SV3, RS19, RS20, RS22 et RS25
Arginine-dihydrolase	4	Toutes excepté SV6, SG1, 5122 et 5286
L-Glutamate-déshydrogénase	24	SM1, SM2, SM9, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SE3, 5122, 5286
L-Alanine-déshydrogénase	26	SM4, SM5, SM7, SE3, SV7, SV8, RS19, RS20, 1, 2
Lécithinase	2	Toutes excepté 5122 et 5286
L-Phénylalanine-désaminase	2	Toutes excepté SM2 et SV9

TABLEAU 3. Hydrates de carbone oxydés avec production d'acide par une fraction seulement des souches

Substrat	No. de souches positives	Souches négatives
D-Glucose	22	SM1, SM2, SM3, SM4, SM7, SM9, SE2, SV6, SV7, RS24, 1, 2, 5122, 5286
D-Mannose	13	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV4, SV8, RS19, RS22 et RS25
D-Fructose	13	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM10, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV3, SV4, SV8 et RS20
D-Galactose	13	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV4, SV8, RS19, RS20 et RS25
L-Rhamnose	1	Toutes excepté SM5
L-Fucose	1	Toutes excepté RS22
Cellobiose	11	Toutes excepté SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SE3, SE4, SV4, SV8, SV9 et RS17
Maltose	19	SM1, SM2, SM3, SM4, SM7, SM9, SM10, SM11, SE2, SV6, SV7, SG1, RS24, 1, 2, 5122, 5286
Lactose	10	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM12, SV4, SV8, RS19, RS20, RS22 et RS25
D-Tréhalose	14	Toutes excepté SM5, SM6, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV3, SV4, SV8, RS19, RS20, RS22 et RS25
D-Mélibiose	9	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16 et SV8
Saccharose	9	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SV4, SV8, RS19, RS20, RS22 et RS25
Salicine	6	Toutes excepté SM12, SM13, SM14, SM15, SM16 et SV3
Raffinose	3	Toutes excepté SM5, SM8 et SV8
D-Mélézitose	6	Toutes excepté SM6, SM13, SM14, SM15, SM16 et SV4
D-Xylose	8	Toutes excepté SM5, SM6, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16 et RS20
D-Ribose	17	Toutes excepté SM5, SM6, SM8, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SE3, SE4, SV3, SV4, SV8, RS19, RS22 et RS25
L-Arabinose	6	Toutes excepté SM8, SM12, SM13, SM14, SM15 et RS20
D-Arabinose	1	Toutes excepté SM5
Methyl α -D-glucoside	5	Toutes excepté SM12, SM13, SM14, SV4 et SV8
D-Gluconate	5	Toutes excepté SM12, SM13, SM14, SM15 et SM16
D-Sorbitol	7	Toutes excepté SM5, SM8, SM12, SM15, SV3, SV4 et SV8
D-Mannitol	13	Toutes excepté SM5, SM8, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, SV3, SV4, SV8, RS19, RS22 et RS25
L-Arabitol	1	Toutes excepté SV3
D-Arabitol	2	Toutes excepté SM5 et SV8
Arbutine	1	Toutes excepté SM15
mésio-Erythritol	3	Toutes excepté SM5, SM6 et SM8
Glycérol	9	Toutes excepté SM5, SM6, SM12, SM13, SM15, SM16, SV3, RS22 et RS25

TABLEAU 4. Acides organiques utilisés par une fraction seulement des souches

Substrat	No. de souches positives	Souches négatives
Acétate	34	SM9, SM13
Propionate	19	SM1, SM2, SM4, SM5, SM6, SM7, SM8, SM9, SM10, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16, 1, 2
Butyrate	1	Toutes excepté SE2
Isobutyrate	9	Toutes excepté SM3, SE2, SV3, SV6, SV8, RS19, RS22, RS25 et 1
Valérate	11	Toutes excepté SM3, SM4, SM6, SM7, SM8, RS22, RS24, RS25, 1, 5122 et 5286
Isovalérate	14	Toutes excepté SM3, SM4, SM7, SE2, SV7, SV9, RS19, RS22, RS24, RS25, 1, 2, 5122 et 5286
Pyruvate	33	SM9, SM10, SG1
DL-Lactate	24	SM1, SM9, SM11, SM14, SE2, SE3, SE4, SV6, SV8, SG1, RS17, 5286
DL-3-Hydroxybutyrate	29	SM5, SM9, SM12, SV7, SG1, RS17, RS20
Glycolate	1	Toutes excepté SV3
Succinate	20	SM1, SM2, SM5, SM8, SM9, SM10, SM11, SM13, SE2, SE3, SV6, SG1, RS17, RS19, RS20, 5286
L-Malate	26	SM1, SM2, SM9, SM10, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, SM16
Fumarate	28	SM2, SM5, SM9, SM10, SE3, SE4, SV4, RS17
Citrate	23	SM1, SM2, SM3, SM6, SM8, SM9, SM10, SM11, SM12, SM13, SM14, SM15, 5286
α -Cétoglutarate	4	Toutes excepté SV3, RS25, 1 et 2
Glutarate	1	Toutes excepté RS22
Tartrate	16	Toutes excepté SE3, SE4, SV3, SV4, SV6, SV7, SV8, SV9, RS17, RS19, RS20, RS22, RS24, RS25, 5122 et 5286
Glycine	21	SM2, SM3, SM5, SM6, SM7, SM8, SM9, SM10, SM11, SM12, SM13, SM15, SM16, 1, 2
α -L-Alanine	8	Toutes excepté SE2, SV3, SV4, SV6, SV8, RS19, RS22 et RS25
Aspartate	8	Toutes excepté SV7, SV8, RS19, RS22, RS25, 1, 2 et 5286
Asparagine	26	SM1, SM3, SM5, SM6, SM8, SM9, SM10, SM12, SM13, SM16
Glutamate	33	SM9, SM10, SG1
Glutamine	2	Toutes excepté SV6 et 2

deux sous-groupes *a* et *b* de quatre souches chacun. La souche SV7 se rattache indirectement au sous-groupe *a*. Les souches SV4, SV8 et RS11 se rattachent indirectement à la classe X. La sous-classe 2 comprend 14 souches douées d'activité fermentaire. Elle est constituée du groupe D de 12 souches et de 2 souches isolées RS7 et RS9. Les souches SV3 et RS14 se rattachent indirectement à la sous-classe 2. Le groupe E se situe à part et comprend trois souches dénuées d'activité fermentaire.

Sous-groupe a

Le sous-groupe *a* comprend les souches 1 et 2 de *B. azotoformans*, ainsi que les souches SM4 et

SM7. Le Gram est négatif et la cellule a un diamètre de 0.4 μ m. Les caractères suivants sont positifs: présence d'endospores; mobilité; croissance aux dépens de NO_3^- , de NO_2^- , de N_2O et du fumarate; production de poly- β -hydroxybutyrate; L-glutamate-déshydrogénase; nitrate-réductase A; nitrite-réductase respiratoire; utilisation des acides organiques suivants: acétate, isovalérate, succinate, fumarate, pyruvate, DL-lactate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, citrate, asparagine et L-glutamate. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de NO; fermentation anaérobie du glucose; croissance à pH 5.6; croissance en présence de N_3^- , de NaCl à 5% ou de

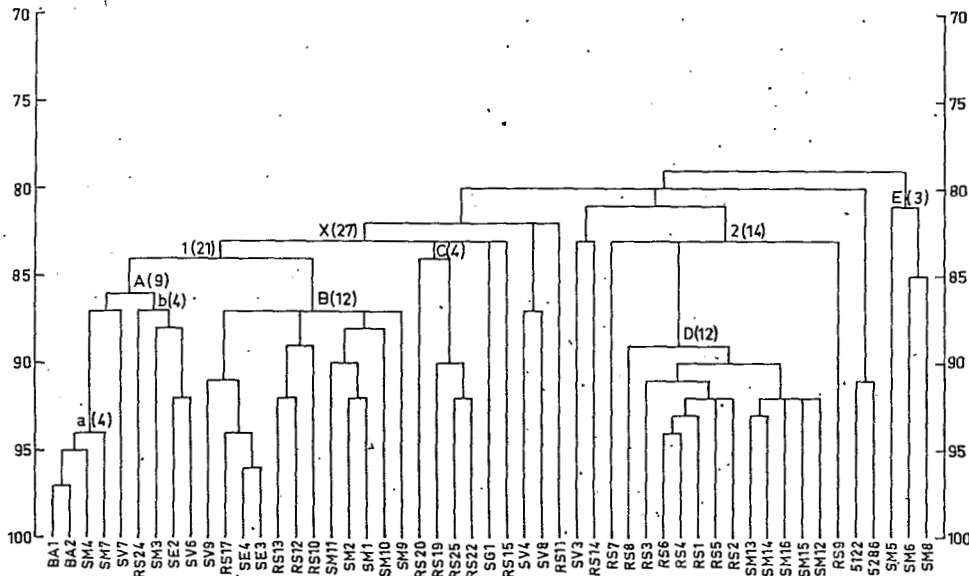


FIG. 1. Dendrogramme.

KNO_3 à 8%; production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine, d'acide benzoïque à partir de l'hippurate et d'indole; réaction de Voges-Proskauer; catalase; hydrolyse de la gélatine, de l'amidon, du "Tween 80" et de l'urée; L-phénylalanine-désaminase; arginine-dihydrolase; β -galactosidase; L-alanine-déshydrogénase; utilisation des acides organiques suivants: propionate, butyrate, glutarate, glycolate, tartrate et α -L-alanine; production d'acide, en aérobiose, à partir du glucose et des autres hydrates de carbone.

La souche SM4 se différencie des souches 1 et 2 de *B. azotoformans* par une température maximale de croissance de 36°C au lieu de 45°C, par son aptitude à utiliser la glycine et par son inaptitude à utiliser l' α -cétoglutarate et l'aspartate.

La souche SM7 se différencie des souches 1 et 2 de *B. azotoformans* par sa morphologie coloniale, par une température maximale de croissance de 39°C au lieu de 45°C, par une meilleure tolérance envers le nitrite, par son incapacité de croître aux dépens de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, par son aptitude à croître en présence de lysozyme et par son incapacité d'utiliser l' α -cétoglutarate et l'aspartate.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN est de 39.6 ± 0.5 .

Sous-groupe b et souche SV7

Le sous-groupe b comprend les souches RS24, SM3, SE2 et SV6. Le Gram est variable et le diamètre de la cellule est compris entre 0.5 et 0.6 μm . Les caractères suivants sont positifs: présence d'endospores; mobilité; croissance aux dépens de NO_3^- , de NO_2^- et de N_2O ; L-glutaminate-

déshydrogénase; nitrate-réductase A; nitrite-réductase respiratoire; utilisation des acides organiques suivants: acétate, propionate, fumarate, pyruvate, L-malate et L-glutamate. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de NO et du fumarate; fermentation anaérobie du glucose; croissance à pH 5.6; croissance en présence de lysozyme; production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine; production d'indole; réaction de Voges-Proskauer; catalase; hydrolyse de la gélatine et de l'amidon; L-phénylalanine-désaminase; utilisation des acides organiques suivants: glutarate, α -cétoglutarate et glycolate; production d'acide, en aérobiose, à partir du glucose et des autres hydrates de carbone.

Les colonies des souches RS24 et SV7 sont opaques et petites; alors que celles des souches SM3, SE2 et SV6 s'étalent sur la gélose. Seule la souche RS24 croît aux dépens de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$. La souche SV7 est à Gram-négatif et asporogène, a un diamètre de 0.4 μm et possède la catalase.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN des cinq souches est de 39.4 ± 0.5 .

Groupe B

Le groupe B comprend les souches SV9, RS17, SE4, SE3, RS13, RS12, RS10, SM11, SM2, SM1, SM10 et SM9. Les colonies sont translucides. Le Gram est variable. Le diamètre de la cellule est de 0.4 μm à l'exception de la souche SM9 dont la cellule a un diamètre compris entre 0.5 et 0.6 μm . Seule la souche RS17 est asporogène. La concentration maximale de NO_2^- permettant la croissance est comprise entre 200 et 400 mM. Les caractères

suyvants sont positifs: mobilité; croissance aux dépens de NO_3^- , de NO_2^- et de N_2O ; croissance en présence de KNO_3 à 8%; catalase et nitrite-réductase respiratoire. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de NO ; production de poly- β -hydroxybutyrate; fermentation anaérobie du glucose; croissance à pH 5.6 et en milieu contenant N_3^- ; production d'indole; réaction de Voges-Proskauer; hydrolyse de la gélatine et de l'amidon; arginine-dihydrolase; β -galactosidase; utilisation du glutarate.

Six souches (SE3, SE4, SV9, RS17, SM1 et SM10) sur douze croissent aux dépens de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$. Seules les souches SM10 et SM11 croissent aux dépens du fumarate. Les souches RS10, RS12, RS13, RS17, SM2, SE3 et SV9 produisent un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine. Seule la souche SE3 ne possède pas la L-analine-déshydrogénase. La nitrate-réductase A est présente seulement chez les souches SM1, SM2 et SM10. Les souches SM1, SM2 et SM9 ne produisent pas d'acide à partir du glucose et des autres hydrates de carbone; alors que les autres souches produisent de l'acide à partir d'un petit nombre d'hydrates de carbone.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN est de 39.7 ± 0.5 .

Groupe C

Le groupe C comprend les souches RS20, RS19, RS25 et RS22. Les colonies des souches RS19 et RS20 sont translucides; alors que celles des souches RS22 et RS25 sont opaques et grandes. Le Gram est variable. Le diamètre de la cellule est de $0.4 \mu\text{m}$ à l'exception de la souche RS22 dont la cellule a un diamètre compris entre 0.5 et $0.6 \mu\text{m}$. Seule la souche RS19 est non mobile. La concentration maximale de NO_2^- permettant la croissance est comprise entre 200 et 400 mM. Les caractères suivants sont positifs: présence d'endospores; croissance aux dépens de NO_3^- et de NO_2^- ; production d'acide benzoïque à partir de l'hippurate; catalase; hydrolyse de la gélatine, du "Tween 80" et de l'urée; β -galactosidase; L-glutamate-déshydrogénase; nitrite-réductase respiratoire; utilisation des acides organiques suivants: acétate, propionate, fumarate, pyruvate, DL-lactate, L-malate, tartrate, citrate, glycine, asparagine et L-glutamate; production d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: glucose, maltose, lactose, D-tréhalose et saccharose. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de NO et du fumarate; fermentation anaérobie du glucose; production de poly- β -hydroxybutyrate; croissance en présence de N_3^- ou de lysozyme; production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine; production d'indole; réaction de

Voges-Proskauer; L-phénylalanine-désaminase; arginine-dihydrolase et nitrate-réductase A; utilisation des acides organiques suivants: butyrate, glycolate et glutamine; production d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: L-rhamnose, méthyl α -D-glucoside, gluconate, D-arabinose, cellobiose, mélibiose, raffinose, mélézitose, arbutine, salicine, D-sorbitol, L-arabitol, D-arabitol et méso-érythritol.

La souche RS19 ne croît pas aux dépens de NO bien qu'elle ait été isolée en présence de cet accepteur d'électrons. Seule la souche RS25 ne croît pas en présence de NaCl à 5% ou de KNO_3 à 8%. La souche RS20 se différencie des trois autres souches par les caractères suivants: une température maximale de croissance de 41°C au lieu de 47 – 48°C ; l'inaptitude à croître aux dépens de N_2O et de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$; l'absence d'amylase; l'incapacité de croître à pH 5.6 et d'utiliser l'isobutyrate, l'isovalérate, le DL-3-hydroxybutyrate, la α -L-alanine et l'aspartate; l'aptitude à produire de l'acide à partir du fructose, du xylose et du L-arabinose; l'inaptitude à produire de l'acide à partir du mannose, du robose et du mannitol.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN est de 40.8 ± 1.3 .

Groupe D

Le groupe D comprend les souches RS8, RS3, RS6, RS4, RS1, RS5, RS2, SM13, SM14, SM16, SM15 et SM12. Les colonies sont translucides. Le Gram est variable et le diamètre de la cellule est de $0.4 \mu\text{m}$. La seule souche asporogène est SM15. La seule souche non mobile est RS3. La température maximale de croissance est comprise entre 40 et 42°C . La concentration maximale de NO_2^- permettant la croissance est comprise entre 60 et 200 mM. Les caractères suivants sont positifs: croissance aux dépens de NO_3^- , de NO_2^- et de N_2O ; fermentation anaérobie du glucose; hydrolyse du "Tween 80"; β -galactosidase; L-alanine-déshydrogénase; nitrite-réductase respiratoire; utilisation du pyruvate; production d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: glucose, fructose, galactose, mannose, xylose, ribose, maltose, cellobiose, D-tréhalose, salicine et mannitol. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ et du fumarate; production de poly- β -hydroxybutyrate; croissance à pH 5.6; croissance en présence de N_3^- ou de NaCl à 5%; production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine, d'acide benzoïque à partir de l'hippurate et d'indole; hydrolyse de la gélatine et de l'amidon; L-phénylalanine-désaminase; utilisation des acides organiques suivants: propionate, valérate, isovalérate, glutarate, glycolate, tartrate et glutamine; production

d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: L-rhamnose, L-fucose, D-arabinose, L-arabitol, D-arabitol et méso-érythritol.

Seules les souches SM15 et SM16 ne croissent pas aux dépens de NO et n'ont pas de catalase. La seule souche qui ne croît pas en présence de KNO₃ à 8% est RS8. Seule la souche SM15 croît en présence de lysozyme et donne une réaction de Voges-Proskauer positive. Aucune des souches de ce groupe ne possède la nitrate-réductase A.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN est de 41.1 ± 1 .

Groupe E

Le groupe E comprend les souches SM5, SM6 et SM8. Les colonies de la souche SM5 sont translucides alors que celles des souches SM6 et SM8 sont opaques et grandes. Le Gram est variable. Le diamètre des cellules des souches SM5 et SM6 est de 0.4 µm; alors que celui de la cellule de la souche SM8 est compris entre 0.5 et 0.6 µm. La seule souche non mobile est SM5. Les caractères suivants sont positifs: présence d'endospores; croissance aux dépens de NO₃⁻, de NO₂⁻ et de N₂O; production d'acide benzoïque à partir de l'hippurate; catalase; uréase; β-galactosidase; L-glutamate-déshydrogénase; nitrate-réductase A; nitrite-réductase respiratoire; utilisation des acides organiques suivants: acétate, pyruvate, DL-lactate, L-malate et L-glutamate; production d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: glucose, fructose, galactose, mannose, ribose, maltose, lactose, mélibiose, saccharose et méso-érythritol. Les caractères suivants sont négatifs: croissance aux dépens de NO, de S₄O₆²⁻ et du fumarate; fermentation anaérobie du glucose; croissance à pH 5.6; croissance en présence de N₃⁻ ou de lysozyme; production d'un pigment brun en milieu contenant de la tyrosine; réaction de Voges-Proskauer; hydrolyse de l'amidon, L-phénylalanine-désaminase; arginine-dihydrolase; utilisation des acides organiques suivants: propionate, butyrate, isobutyrate, isovalérate, glutarate, α-cétoglutarate, glycolate, tartrate, glycine, α-L-alanine, aspartate, asparagine et glutamine; production d'acide, en aérobiose, à partir des hydrates de carbone suivants: L-fucose, méthyl α-D-glucoside, gluconate, cellobiose, arbutine, salicine et L-arabitol.

Seule la souche SM5 ne produit pas de poly-β-hydroxybutyrate, hydrolyse la gélatine et le "Tween 80," et ne possède pas la L-alanine-déshydrogénase. Seule la souche SM8 produit de l'indole et ne croît pas en présence de NaCl à 5% ou de KNO₃ à 8%.

La valeur moyenne du pourcentage en G + C de l'ADN est de 41.6 ± 1.2 .

Discussion

La taxonomie numérique confirme l'hétérogénéité qu'avait déjà dévoilée l'étude des 15 premières souches (Pichinoty *et al.* 1979). Deux souches sont apparentées à *B. azotoformans* qui est une espèce étroite au sens de Stanier (Pichinoty *et al.* 1978). Les autres souches diffèrent nettement à la fois de *B. brevis* et de *B. azotoformans*. La majorité d'entre elles se répartissent en plusieurs groupes qui sont définis par un ensemble de caractères distinctifs, les uns positifs et les autres négatifs. Quelques souches se situent à part. Les 10 souches qui tolèrent l'oxyde nitrique et utilisent ce gaz comme accepteur terminal d'électrons, appartiennent toutes au groupe D qui comprend d'ailleurs deux autres souches dépourvues de cette propriété. Les pourcentage en G + C moyens sont inférieurs à 41 chez les souches appartenant aux groupes A, B et C; alors qu'ils sont légèrement supérieurs à cette valeur chez les souches appartenant aux groupes D et E. Les très faibles variations de ce paramètre ne sont probablement pas fortuites et suggèrent l'existence d'un lien de parenté entre ces souches. Seules cependant les évaluations du degré d'homologie entre leurs ADN par les techniques d'hybridation permettraient de savoir si l'on a affaire à une espèce large au sens de Stanier (1976) ou bien à plusieurs espèces. L'isolement et l'étude de nouvelles souches apporterait sans doute peu d'informations nouvelles.

Du point de vue écologique, le présent travail établit l'ubiquité de ces bactéries que l'on trouve aussi bien dans les sols de régions tempérées que dans les sols de régions tropicales.

Remerciements

Nous exprimons nos remerciements au Dr A. Bianchi (Station Marine, Marseille) qui a mis à notre disposition son programme de calcul en taxonomie numérique. L'aide technique de Mme C. Job a été appréciée.

- GORDON, R. E., W. C. HAYNES et C. H.-N. PANG. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. United States Department of Agriculture, Washington.
- 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.
- PICHINOTY, F., M. MANDEL et J.-L. GARCIA. 1979. The properties of novel mesophilic denitrifying *Bacillus* cultures found in tropical soils. J. Gen. Microbiol. 115: 419-430.
- SKERMAN, V. B. D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- SNEATH, P. H. A., et R. R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman Co., San Francisco.
- STANIER, R. Y. 1976. Réflexions sur la taxonomie des *Pseudomonas*. Bull. Inst. Pasteur (Paris), 74: 255-270.