

La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*

F. PICHINOTY

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

J.-L. GARCIA

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

ET

C. JOB ET M. DURAND

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

Approuvé le 29 septembre 1977

PICHINOTY, F., J.-L. GARCIA, C. JOB et M. DURAND. 1978. La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*. Can. J. Microbiol. 24: 45-49.

Le pouvoir dénitrifiant de 15 souches de *Bacillus licheniformis* a été évalué. D'une façon générale la production de N_2 par les cultures en milieu complexe contenant NO_3^- est irrégulière et assez lente. Trois souches ne produisent jamais de gaz. *Bacillus licheniformis* croît rapidement, en anaérobiose, en milieu peptoné contenant NO_3^- . Ce composé est réduit en NO_2^- . Aucune des souches ne croît en milieu peptoné en présence de NO_2^- ou N_2O comme substrats respiratoires. Elles ne croissent pas non plus sous une atmosphère contenant 10% de NO et 90% de N_2 . La dénitrification par les suspensions cellulaires a été étudiée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. La production de N_2O et N_2 à partir de NO_3^- ou NO_2^- est toujours faible ou nulle. L'oxyde nitrique est réduit en N_2O à une vitesse appréciable. Toutes les souches synthétisent la nitrate-réductase A en anaérobiose et en présence de NO_3^- . Par contre l'activité nitrite-réductase des extraits enzymatiques mesurée en présence de tétraméthyl-*p*-phénylènediamine comme donneuse d'électrons est toujours nulle ou négligeable.

PICHINOTY, F., J.-L. GARCIA, C. JOB, and M. DURAND. 1978. La dénitrification chez *Bacillus licheniformis*. Can. J. Microbiol. 24: 45-49.

The denitrifying capacity of 15 strains of *Bacillus licheniformis* was evaluated. In general, N_2 production by the cultures on complex media containing NO_3^- is irregular and quite slow and three of the strains never produce gas. *Bacillus licheniformis* grows rapidly in anaerobiosis on peptone medium containing NO_3^- which is reduced to NO_2^- . None of the strains grow in peptone medium with NO_2^- or N_2O as the respiratory substrate, nor do they grow under an atmosphere of 10% NO - 90% N_2 . Denitrification was studied in cell suspensions using gas chromatography. N_2O production from NO_3^- or NO_2^- is always weak at best; nitric oxide is reduced to N_2O at an appreciable rate. All the strains synthesize nitrate reductase A in anaerobiosis when NO_3^- is present. In cell extracts, nitrite reductase activity is always negligible or nil with tetramethyl-*p*-phenylenediamine as an electron donor.

Introduction

Bacillus licheniformis est l'une des bactéries dénitrifiantes les plus anciennement connues, puisqu'elle a été décrite en 1910 par Beijerinck et von Minkman (1). Elle se présente sous la forme de bâtonnets, à Gram-positif, mobiles, produisant des spores ovales non déformantes, ce qui la classe dans le premier groupe morphologique du genre *Bacillus* (5, 6, 8). Elle est ubiquitaire dans les sols. On peut l'isoler aisément par culture d'enrichissement, en anaérobiose, en bouillon peptoné contenant 8% de KNO_3 (1). La tolérance osmotique élevée de *B. licheniformis* rend ce milieu hautement sélectif.

Nos connaissances sur la dénitrification chez *B. licheniformis* sont dues essentiellement au travail classique de Verhoeven (17). Cet auteur a montré

que les cultures d'enrichissement et les souches isolées produisaient de l'oxyde nitreux et de l'azote. La dénitrification est plus intense à 40 ou 45°C qu'à 30°C. A cette époque l'oxyde nitreux était identifié et dosé, soit par réduction par H_2 en présence d'un fil de platine chauffé, soit en tirant profit de sa solubilité dans l'alcool.

Il était nécessaire de réévaluer le pouvoir dénitrifiant de *B. licheniformis* en faisant usage des techniques modernes. Au cours du présent travail, l'identification et le dosage de NO, N_2O et N_2 ont été réalisés à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. Enfin nous avons recherché dans les extraits enzymatiques, la nitrate-réductase, qui catalyse la réduction de NO_3^- en NO_2^- , et la nitrite-réductase, qui catalyse la réduction de NO_2^- en NO.

29 NOV. 1978

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

Collection de Référence

no 8432 Bio.Sols

Matériel et méthodes

Isolement à partir du sol et étude de deux souches de B. licheniformis

Les souches A et B ont été isolées à partir de deux échantillons de sols provenant respectivement de la forêt de la Sainte-Baume et de la pinède de Luminy. Ces sites se trouvent à proximité de Marseille. Les échantillons n'ont pas été pasteurisés. Les cultures d'enrichissement ont été faites, à 40°C, sous vide en ballons de 250 ml contenant 50 ml du milieu suivant: bacto-peptone, 10 g; KNO₃, 80 g; milieu de base, 1000 ml; pH = 7. Dès le premier repiquage, l'on ajoute 0.5% de glycérol. Après plusieurs passages on étale sur agar nutritif. Les boîtes sont mises en incubation aérobie à 32°C. Une colonie est repiquée. L'opération est répétée plusieurs fois.

Les deux souches se présentent sous la forme de bâtonnets, à Gram-positif, mobiles, produisant des spores ovales non déformantes. Sur agar nutritif les colonies sont plissées, irrégulières, opaques et s'étalent rapidement. Les deux bactéries croissent sur gélose nutritive à pH 6, en milieu au KCN de Braun et en bouillon peptoné contenant 7% de NaCl. Elles ne croissent pas en présence de 0.001% de lysozyme. La croissance en tubes de bouillon nutritif non agités est accompagnée de la formation d'un voile abondant. La réaction à l'oxydase est négative. Les organismes produisent de l'acétyl-méthyl-carbinol, mais ne donnent ni indole ni H₂S. On n'observe pas de production de pigment sur gélose à la pomme de terre ni sur gélose à la tyrosine. La gélatine est liquéfiée. L'amylase exocellulaire, l'uréase, la nitrate-réductase et la β-galactosidase sont présentes. La lipase, la tétrathionate-réductase, la lysine-décarboxylase, l'ornithine-décarboxylase, la tryptophane-désaminase et la phénylalanine-désaminase sont absentes. Les hydrates de carbone suivants sont attaqués avec production d'acide: glucose, L-arabinose, ribose, mélibiose, galactose, mannose, lévulose, L-rhamnose, saccharose, maltose, D-tréhalose, α-méthyl-glucoside, cellobiose, glycérol, D-mannitol, D-sorbitol, méso-inositol, amidon, esculine, arbutine, D-gluconate et salicine. Le D-arabinose, le D-fucose, le L-fucose, le L-arabitol, l'érythritol, le L-sorbose, le lactose et le dulcitol ne sont pas attaqués. Les deux souches croissent, en anaérobiose, en milieu peptoné contenant du glucose ou du nitrate. Elles se développent à 50°C. Tous les caractères morphologiques et biochimiques ci-dessus appartiennent à l'espèce *B. licheniformis* (5, 6, 8).

Souches de collection

Les souches suivantes proviennent du Laboratoire de Microbiologie de la "Technische Hogeschool," à Delft. Nous avons mentionné successivement et entre parenthèses, le numéro d'ordre, la référence figurant dans la thèse de Verhoeven (17), le nom du bactériologiste qui a procédé à l'isolement et la source: 2 (LMD 52.13; H0; W. Verhoeven; jambon de conserve); 3 (LMD 52.14; H1; W. Verhoeven; jambon de conserve); 4 (LMD 52.15; H2; W. Verhoeven; jambon de conserve); 5 (LMD 33.10; *Bacillus nitroxus*; J. W. v. Dalfsen; sol); 6 (LMD 52.16; P1; J. W. v. d. Walt; sol); 7 (LMD 52.17; P2; W. Verhoeven; sol); 8 (LMD 52.18; P5; W. Verhoeven; sol pasteurisé); 9 (LMD 52.19; P6; W. Verhoeven; feuilles pourries); 10 (LMD 52.20; Pn; W. Verhoeven; sol pasteurisé).

Les souches suivantes proviennent de la collection de l'Institut Pasteur: CIP A42, isolée d'un liquide ventriculaire cérébral (2); CIP 53172, *Tyrophix filiformis*, isolée du lait (3); CIP 5272, souche 601 (NRS 1265) de Gibson, Université d'Edinburgh (6).

Milieus de culture

La composition du milieu minéral de base employé pour la préparation des différents milieux a déjà été décrite (14).

La production de gaz a été étudiée en tubes à essais contenant

10 ml de milieu et un tube renversé. Le milieu contient 1% de bacto-peptone, 1% de glucose, de glycérol ou de DL-lactate de sodium et 0.5% de KNO₃.

Les expériences de croissance ont été réalisées en ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Le milieu contient 1% de bacto-peptone ou 0.4% d'extrait de levure. Le glycérol et le lactate de sodium sont employés à la concentration de 0.5%. Les concentrations de glucose, de KNO₃ et de KNO₂ sont respectivement de 0.4, 0.5 et 0.05%. Les cultures en présence d'un mélange gazeux contenant 10% de NO et 90% de N₂ ont été réalisées dans deux milieux distincts; l'un contient 0.8% de bouillon nutritif, 0.5% d'extrait de levure, 0.5% de bacto-tryptone, 0.5% de glycérol, et a un pH de 7; l'autre contient 0.8% de bouillon nutritif, 0.5% d'extrait de levure, 0.5% de bacto-tryptone, 0.25% de lactate de sodium, et a un pH de 8. Les cultures sont agitées à 32°C afin d'assurer une bonne diffusion de l'oxyde nitrique qui est peu soluble dans l'eau.

La suspension cellulaire utilisée lors de l'étude de la réduction de NO₃⁻ en NO₂⁻ et de NO₂⁻, provient d'une culture anaérobie âgée de 24 h, réalisée dans un milieu contenant 0.2% de glucose, 0.8% de bouillon nutritif et 0.5% de KNO₃, placé en incubation à 32°C.

Les suspensions cellulaires destinées aux études de chromatographie en phase gazeuse proviennent de cultures anaérobies âgées de 24 h, réalisées dans un milieu contenant 0.5% d'extrait de levure, 2% de bio-trypcase, 0.5% de saccharose et 0.5% de KNO₃, placé en incubation à 32°C.

Les cellules destinées à la préparation des extraits enzymatiques proviennent de cultures anaérobies âgées de 24 h, réalisées dans un milieu contenant 0.4% d'extrait de levure, 0.2% de glucose et 0.2% de KNO₃, placé en incubation à 32°C.

Techniques

Le nitrite a été dosé par colorimétrie (16). Les gaz formés au cours de la dénitrification de NO₃⁻, NO₂⁻, NO et N₂O par les suspensions cellulaires ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (4, 14). La recherche des nitrate- et nitrite-réductases a été réalisée sur les extraits enzymatiques préparés par traitement sonique des suspensions cellulaires centrifugées et lavées. La nitrate-réductase a été identifiée par une technique manométrique (15). L'activité nitrite-réductase a été mise en évidence par la production de NO, en anaérobiose, en présence de tétraméthyl-*p*-phénylène-diamine comme donneuse d'électrons (9).

Résultats

Production de gaz par les cultures

Les tubes sont placés en incubation à 32 ou 40°C pendant 8 jours. Le gaz produit demeure emprisonné dans le tube renversé. Celui-ci est du N₂ et non du CO₂ car il n'est pas absorbé par KOH. D'une façon générale le dégagement est irrégulier et assez lent. Du nitrite s'accumule toujours en quantités élevées. Les résultats figurent dans le Tableau 1. Les souches 6, 7 et 10 ne produisent jamais de gaz. Le dégagement gazeux est plus intense à 40°C qu'à 32°C. Il est plus important avec le glycérol qu'avec le lactate. Mais c'est le glucose qui semble donner les meilleurs résultats.

Croissance en présence de différents accepteurs d'électrons respiratoires

On fait le vide dans les ballons contenant NO₃⁻, NO₂⁻ ou le glucose. Les 15 souches croissent rapi-

TABLEAU 1. Production de gaz en tubes de milieu peptoné contenant NO_3^-

Souches	Donneur d'électrons					
	Glycérol		Lactate		Glucose	
	32°C	40°C	32°C	40°C	32°C	40°C
A	++	++	+ -	+	+	+++
B	++	++	+ -	+	+	++
A42	+	+	-	-	+	+++
5272	+	+	-	-	++	++
53172	+	+	-	+ -	+	+++
2	++	++	+ -	-	++	+++
3	+	++	-	-	++	++
4	++	++	-	-	+	+++
5	+	+	+	+	+ -	+
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	++	++	-	+	+	+++
9	+	+	-	-	+++	+++
10	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+ -	+

NOTE: Dégagement abondant: +++; dégagement moyen: ++; dégagement faible: +; résultats indécis: + -.

dement à 32°C, en anaérobiose, lorsque le milieu contient du glucose ou du nitrate. Le glucose subit une fermentation et le nitrate, qui sert d'accepteur d'électrons, est réduit en NO_2^- . Aucune d'elles ne croît à 32 ou 40°C dans un milieu contenant du glycérol ou du lactate, en présence de NO_2^- ou N_2O . Elles ne se développent pas non plus à 32°C, à pH 7 ou 8, sous une atmosphère constituée d'un mélange de NO (10%) et de N_2 (90%). A la concentration employée, l'oxyde nitrique inhibe la croissance de ces bactéries en milieu contenant 0.5% de glucose ou 0.5% de KNO_3 , ou 0.5% de glucose et 0.5% de KNO_3 .

Les 15 souches assimilent le nitrate puisqu'elles croissent en milieu minimal glucosé à 0.5% contenant 0.05% de KNO_3 comme seule source d'azote.

Réduction de NO_3^- et de NO_2^- par une suspension cellulaire

Nous avons employé une suspension cellulaire de la souche A. L'expérience est réalisée en tubes à essais non agités, c'est-à-dire pratiquement en anaérobiose. La température du bain-marie est de 37°C. Chaque système contient du glucose 50 mM, du tampon phosphate, pH = 7, 82.5 mM, KNO_3 25 mM ou KNO_2 5 mM, et 2.1 mg (poids sec) de cellules par millilitre. Les solutions de nitrate ou de nitrite sont ajoutées au temps zéro. Des prélèvements de 1 ml destinés au dosage du nitrite sont effectués à intervalles de temps réguliers et placés immédiatement dans 3 ml d'acétone pour arrêter la réaction. Les résultats sont indiqués sur la Fig. 1. Le nitrate est réduit en nitrite à une vitesse constante (courbe 1). Bien que l'activité s'ac-

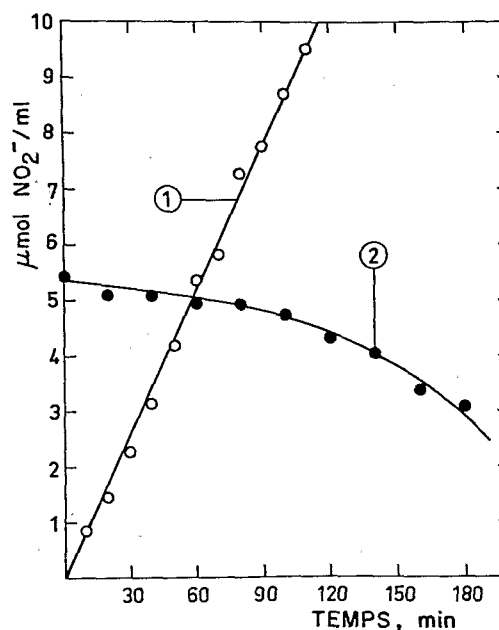


FIG. 1. Réduction de NO_3^- en NO_2^- (courbe 1) et de NO_2^- (courbe 2) par une suspension cellulaire.

croisse en fin d'expérience, la réduction de NO_2^- est comparativement très lente (courbe 2).

Analyses des gaz produits au cours de la dénitrification par les suspensions cellulaires

Les cellules centrifugées et lavées sont remises en suspension dans une solution tamponnée à pH 7 (14) contenant 0.5% d'extrait de levure, 2% de bio-trypcase, 0.5% de saccharose et 100 µg par millilitre de chloramphénicol. La température est

TABLEAU 2. Dénitrification du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitrique et de l'oxyde nitreux par les suspensions cellulaires

Souches	Accepteur d'électrons				
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO	N ₂ O	
	Vitesse de réduction ou de production du gaz				
	N ₂ O produit	N ₂ O produit	NO réduit	N ₂ O produit	N ₂ O réduit
5272	11	8	218	108	4
53172	0	3.7	411	118	8
2	10	13	361	149	12
3	0	1	147	46	6
4	0	1.2	83	25	9
5	15	18	371	148	7
6	0	1.4	76	29	6
7	0	1	45	6	18
8	2.7	4.5	132	62	0
9	0.6	2.5	122	44	3
10	0	0	192	40	32
11	0	4.7	324	105	0

NOTE: Les activités sont exprimées en microlitres de gaz (22°C; pression atmosphérique) produit ou consommé par milligramme d'azote (dosé par micro-Kjeldahl) et par heure.

de 30°C. Les activités spécifiques sont indiquées dans le Tableau 2. La production de N₂ n'est pas mentionnée, car elle est toujours extrêmement faible. En effet, malgré le vide poussé et le gazage à l'hélium, de faibles quantités d'air restent dans les flacons; d'autre part des pollutions peuvent toujours survenir lors de l'injection à la seringue dans la chromatographe. On peut faire les constatations suivantes: la production de N₂O à partir de NO₃⁻ ou NO₂⁻ est toujours faible ou nulle; la réduction de N₂O en N₂ est également négligeable; l'oxyde nitrique est réduit en N₂O à une vitesse appréciable; dans ces expériences toutes les souches examinées se comportent de façon identique.

Recherche des enzymes

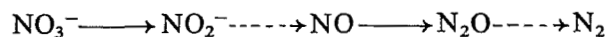
Les 15 souches synthétisent la nitrate-réductase A (15) à un niveau élevé, en anaérobiose et en présence de NO₃⁻. Par contre l'activité nitrite-réductase des extraits est toujours nulle ou négligeable.

Discussion

Toutes les bactéries dénitrifiantes appartenant aux genres *Pseudomonas* (10, 14), *Alcaligenes* (13), *Flavobacterium* (11) et *Bacillus* (12), qui ont été étudiées, présentaient les caractères suivants que ne possèdent aucune des 15 souches de *B. licheniformis*: une réaction à l'oxydase positive, la présence d'un cytochrome de type *c* et de la ni-

trite-réductase respiratoire, et l'aptitude à croître, en anaérobiose, en présence de nitrite et d'oxyde nitreux. L'absence de cytochrome *c* a été récemment établie (7).

Le mécanisme de la dénitrification est aujourd'hui connu (10); il met en jeu les étapes suivantes:



Chacune d'elles est catalysée par une enzyme spécifique. On trouve chez *B. licheniformis* les nitrate- et oxyde nitrique-réductases, mais non les nitrite- et oxyde nitreux-réductases.

Le dégagement lent et irrégulier d'azote observé dans les tubes de cultures correspond au phénomène observé par Verhoeven (17) et Woldendorp (18). La nature véritable de cette dénitrification est inconnue. Une réaction de type van Slyke entre l'acide nitreux et les groupes —NH₂ des acides aminés semble devoir être exclue, car elle exigerait un pH acide; or au contraire le milieu s'alcalinise en cours de croissance. La réduction de NO₂⁻ en N₂ constitue ici un processus secondaire physiologiquement sans utilité puisqu'elle ne permet pas à l'organisme de croître aux dépens de cet accepteur d'électrons.

Nous avons pris soin d'inclure dans le groupe deux souches fraîchement isolées du sol. On peut craindre en effet que certains caractères biochimiques ne soient altérés chez des organismes qui ont été conservés pendant plusieurs années au laboratoire. Or les souches A et B se comportent de la même manière que les autres.

D'une manière générale il semble que Verhoeven (17) ait surestimé le pouvoir dénitrifiant de *B. licheniformis*. En particulier il signale que la souche 6 est capable de croître, en anaérobiose, en présence de N₂O, alors que nous avons observé le contraire. Mais son travail conserve toute sa valeur car les divergences apparues résultent essentiellement des techniques différentes qui ont été employées.

Il est probable que l'espèce nouvelle *Bacillus azotoformans* joue dans la réduction des nitrates *in situ* un rôle beaucoup plus important que *B. licheniformis*, car, contrairement à cette dernière, elle réduit rapidement NO₃⁻, NO₂⁻ et N₂O en N₂ (12).

Remerciements

Les auteurs remercient Mlle Huguette de Barjac (Laboratoire de Lutte Bactériologique contre les Insectes, Institut Pasteur, Paris), qui a identifié les souches A et B.

1. BEIJERINCK, M. W., et D. C. J. VON MINKMAN. 1910. Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 25: 30-63.
2. CHANTEMESSE, M. A., L. MATRUCHOT et A. GRIMBERG. 1917. Une maladie nouvelle, simulant le rhumatisme articulaire aigu, avec ses complications viscérales, et causée par un microbe nouveau (*Mycobacillus synovialis*). Bull. Acad. Natl. Med. Paris, 77: 708-712.
3. DUCLAUX, E. 1882. Sur le lait. Ann. Inst. Natl. Agron. 4: 23-157.
4. GARCIA, J.-L. 1974. Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. Soil Biol. Biochem. 6: 79-84.
5. GIBSON, T., et R. E. GORDON. 1974. Genus I. *Bacillus*. Dans Bergey's Manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 529-550.
6. GORDON, R. E., W. C. HAYNES et C. HOR-NAY PANG. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington. pp. 34-36.
7. JONES, C. W., J. M. BRICE, A. J. DOWNS et J. W. DROZD. 1975. Bacterial respiration-linked proton translocation and its relationship to respiratory-chain composition. Eur. J. Biochem. 52: 265-271.
8. LEMILLE, F., H. DE BARJAC et A. BONNEFOI. 1969. Essai sur la classification biochimique de 97 bacillus du groupe 1, appartenant à 9 espèces différentes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 116: 808-819.
9. MIYATA, M., et T. MORI. 1968. Studies on denitrification. VIII. Production of nitric oxide by denitrifying reaction in the presence of tetramethyl-*p*-phenylenediamine. J. Biochem. (Tokyo), 64: 849-861.
10. PICHINOTY, F. 1973. La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Bull. Inst. Pasteur, Paris, 71: 317-395.
11. PICHINOTY, F., J. BIGLIARDI-ROUVIER, M. MANDEL, B. GREENWAY, G. MÉTÉNIER et J.-L. GARCIA. 1976. The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 42: 349-354.
12. PICHINOTY, F., H. DE BARJAC, M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA. 1976. Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile: *Bacillus azotoformans* n. sp. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127B: 351-361.
13. PICHINOTY, F., M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA. 1975. Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre *Alcaligenes*. C. R. Acad. Sci. (Paris) Ser. D, 281: 1273-1275.
14. PICHINOTY, F., M. MANDEL, B. GREENWAY et J.-L. GARCIA. 1977. Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe *Pseudomonas stutzeri* isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128A: 75-87.
15. PICHINOTY, F., et M. PIÉCHAUD. 1968. Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: méthodes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 114: 77-98.
16. RIDER, B. F., et M. G. MELLON. 1946. Colorimetric determination of nitrites. Ind. Eng. Chem. 18: 96-99.
17. VERHOEVEN, W. 1952. Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. Thèse, Uitgeverij Waltman, Delft.
18. WOLDENDORP, J. W. 1963. The influence of living plants on denitrification. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, 63: 1-100.