

Canadian J. of Microbiology 1978, 24 (6)
juin

743

Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes*: *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*

F. PICHINOTY

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

M. VÉRON

Laboratoire de Bactériologie et Virologie, Faculté de Médecine Necker—Enfants Malades, Paris, France

M. MANDEL

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

M. DURAND ET C. JOB

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

ET

J.-L. GARCIA

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

Approuvé le 15 mars 1978

PICHINOTY, F., M. VÉRON, M. MANDEL, M. DURAND, C. JOB et J.-L. GARCIA. 1978. Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes*: *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. Can. J. Microbiol. 24: 743-753.

Nous avons étudié 43 souches représentant les espèces *Alcaligenes denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. Vingt-cinq d'entre elles ont été isolées du sol par culture d'enrichissement en milieu minimal contenant un acide organique (L-malate, succinate, tartrate, adipate ou itaconate) et N_2O comme accepteur d'électrons respiratoire. Celles-ci constituent un phénon unique avec la souche type d'*A. denitrificans* et 9 autres souches provenant de spécimens cliniques. La souche 4 diffère cependant des 34 autres souches par 12 caractères nutritionnels, par son aptitude à réaliser une scission *méta* des diphénols et par l'absence de tétrathionate-réductase. Les G + C pour cent ont les valeurs suivantes: souches isolées du sol, 66.4 ± 1.1 ; souches de collection, 67.0 ± 1.3 . Les 5 souches d'*A. odorans* se différencient des 34 souches d'*A. denitrificans* (souche 4 non comprise) par leur incapacité à dénitrifier le nitrate et à utiliser le D-saccharate, l'adipate, le pimélate, le subérate, le β -hydroxy- β -méthylglutarate, le *méso*-tartrate, l'azélaïdate et l'itaconate. Leur G + C pour cent est nettement plus faible: 56.1 ± 0.4 . Du point de vue nutritionnel les 3 souches d'*A. faecalis* ressemblent à *A. denitrificans*. Elles s'en distinguent cependant par leur incapacité de croître, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O et $S_4O_6^{2-}$, et par un G + C pour cent légèrement plus faible: 64.3 ± 0.0 . Les 43 souches synthétisent de l'acide poly- β -hydroxybutyrique. Aucune d'elles n'est chimio-lithotrophe.

PICHINOTY, F., M. VÉRON, M. MANDEL, M. DURAND, C. JOB, and J.-L. GARCIA. 1978. Etude physiologique et taxonomique du genre *Alcaligenes*: *A. denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis*. Can. J. Microbiol. 24: 743-753.

We have studied 43 strains of the species *Alcaligenes denitrificans*, *A. odorans*, and *A. faecalis*. Twenty-five of them were isolated by enrichment culture on minimal medium containing an organic acid (L-malate, succinate, tartrate, adipate, or itaconate) and N_2O as a respiratory electron acceptor. These constitute a single phenon with the *A. denitrificans* strain type and 9 other strains isolated from clinical specimens. However, strain 4 differs from the other 34 strains in 12 nutritional characters, in its ability to effect a *meta* cleavage of diphenols, and by the absence of tetrathionate reductase. The percentages of G + C are the following: strains isolated from soil, 66.4 ± 1.1 ; collection strains, 67.0 ± 1.3 . The 5 strains of *A. odorans* differ from the 34 strains of *A. denitrificans* (not including strain 4) in their inability to denitrify nitrate and use D-saccharate, adipate, pimelate, suberated, β -hydroxy- β -methylglutarate, *meso*-tartrate, azelate, and itaconate. Their percentage of G + C is much lower: 56.1 ± 0.4 . From the nutritional point of view the 3 strains of *A. faecalis* resemble *A. denitrificans*. However, they differ from the latter by their inability to grow anaerobically on NO_3^- , NO_2^- , N_2O , and $S_4O_6^{2-}$, and by a slightly lower percentage of G + C: 64.3 ± 0.0 . The 43 strains synthesize poly- β -hydroxybutyric acid. None of them is chemolithotrophic.

Introduction

Le genre *Alcaligenes* regroupe actuellement la plupart des bactéries aérobies, oxydase-positives, se présentant sous la forme de petits bâtonnets mobiles, à Gram négatif, péritriches, et dont la

teneur en guanine + cytosine de l'ADN est comprise entre 58 et 70 moles pour cent (Hendrie et al. 1974; Holding et Shewan 1974). Les deux espèces chimio-lithotrophes *Alcaligenes* *entrophilus* et *A. paradoxus*, qui croissent aux dépens de H_2

6 AVR. 1979
O. B. S. L. O. M.
Collection de Référence

ex 1 n° 3573 Bio Sols

comme source d'énergie, ont été décrites de façon détaillée (Davis et al. 1969; Holding et Shewan 1974). Par contre les espèces *Alcaligenes denitrificans*, *A. odorans* et *A. faecalis* n'ont jamais fait l'objet d'une étude portant sur un grand nombre de caractères. Leur nutrition et leur physiologie étaient jusqu'ici si mal connues que, dans la dernière édition du *Bergey's manual*, Holding et Shewan (Hendrie et al. 1974; Holding et Shewan 1974) n'ont retenu qu'une seule espèce dénommée *A. faecalis*.

Un historique complet et critique de l'espèce *A. faecalis* a été fait par Thibault (Thibault 1961) en 1961. L'épithète *A. denitrificans* a été employée pour la première fois en 1954 par Leifson et Hugh (Leifson et Hugh 1954) pour désigner une bactérie dénitrifiante, à Gram négatif, non sporulée et péritriche, isolée du sol. L'espèce *A. odorans* a été décrite en 1963 par Málek et al. (Málek et al. 1963) qui ont montré qu'elle ne dénitrifiait pas NO_3^- et que ses cultures présentaient une odeur fruitée caractéristique. On sait maintenant qu'elle dénitrifie NO_2^- (Chatelain 1969).

L'identification des souches d'*Alcaligenes* isolées en milieu hospitalier présentait des difficultés car elle était en grande partie fondée sur des caractères négatifs tels que l'absence de gélatinase, d'amylase, de lipase, d'uréase, et l'incapacité d'attaquer les hydrates de carbone (De Ley et al. 1970; Gilardi 1971, 1973; Gilardi et Hirschl 1969; Pickett et Pedersen 1970). On sait en effet que les tests et les milieux classiques qui permettent d'identifier les entérobactéries ne peuvent être appliqués aux germes aérobies stricts. Nous retrouvons ici une situation qui prévalait jadis chez les *Pseudomonas*. Stanier et al. (Stanier et al. 1966) ont montré que l'étude complète de la nutrition carbonée rendait possible la différenciation des espèces appartenant à ce genre.

Nous avons étudié de nombreuses souches dénitrifiantes isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. D'autres souches issues pour la plupart de spécimens cliniques ont également été examinées. Près de 200 caractères ont été retenus. La réduction du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitreux et du tétrathionate a retenu particulièrement notre attention. La teneur en guanine + cytosine de l'ADN de toutes les souches a été déterminée. L'une des souches isolées du sol a déjà été décrite dans une note préliminaire (Pichinoty et al. 1975).

Matériel et méthodes

Souches de collection

Les souches suivantes proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris): *A. denitrificans* 5872, isolé de crachats à

l'Institut Pasteur; *A. denitrificans* 6230, origine inconnue; *A. denitrificans* R799, isolé d'un ulcère à l'Hôpital Saint-Joseph de Paris; *A. denitrificans* R783, isolé d'un prélèvement de moignon à l'Hôpital Saint-Joseph de Paris; *A. denitrificans* 6819, isolé d'urine à l'Hôpital Saint-Joseph de Paris; *A. denitrificans* 6081, prélèvement pharyngé; *A. faecalis* 5758, isolé de crachats à l'Institut Pasteur; *A. faecalis* 6075, isolé d'un prélèvement pharyngé; *A. odorans* 6273, isolé d'un pus chez un brûlé au Centre Hospitalier de Metz; *A. odorans* var. *viridans* E634, isolé par hémoculture chez un enfant; *A. odorans* var. *viridans* 2681, isolé de la gorge d'un enfant; *A. odorans* var. *viridans* 2746, isolé de la gorge d'un enfant; *A. odorans* 6080, origine inconnue.

Les souches suivantes proviennent de la Collection du Dr. Gilardi (Department of Laboratories, Hospital for Joint Diseases and Medical Center, New York): *A. denitrificans* 2254, isolé d'un ulcère de la jambe; *A. denitrificans* 2127, environnement hospitalier; *A. denitrificans* 1885, isolé d'urine; *A. denitrificans* 1875, isolé d'une plaie à la jambe.

La souche 15173 d'*A. denitrificans*, qui a été isolée du sol (Leifson et Hugh 1954), constitue la souche type de l'espèce.

Le numéro d'inscription de chaque souche à la Collection de l'Institut Pasteur figure dans le Tableau 6.

Souches isolées du sol

Les 25 souches ont été isolées par culture d'enrichissement dans le milieu minimal suivant contenant 0.4% de l'aliment carboné: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3.575 g; KH_2PO_4 , 0.98 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g; NH_4Cl , 0.5 g; solution contenant des métaux lourds (Pichinoty et al. 1977c), 0.2 ml; eau distillée, 1000 ml; pH 7. On utilise des ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Ceux-ci sont remplis de N_2O pur après avoir été ensemencés avec l'échantillon. Il faut éliminer les traces d'oxygène en faisant plusieurs fois le vide avec une pompe. Il n'est pas nécessaire d'agiter les ballons car l'oxyde nitreux est très soluble dans l'eau. La température d'incubation est de 32°C. Après quelques jours une croissance abondante et un dégagement gazeux se manifestent. Plusieurs passages sont alors effectués dans les mêmes conditions. On procède ensuite à un étalement sur un milieu minimal de même composition solidifié par l'addition de 1.4% d'agar. Les boîtes sont mises en incubation aérobie à 32°C. Une colonie est repiquée. Après plusieurs étalements successifs, on s'assure de la pureté de la culture. On vérifie que la bactérie isolée croît en anaérobiose aux dépens de N_2O et donne une réaction franchement positive au test à l'oxydase.

L'origine du sol ayant servi à l'ensemencement, la nature de l'aliment carboné utilisé lors de l'isolement et le numéro d'inscription à la Collection de l'Institut Pasteur figurent dans le Tableau 5.

Techniques

La plupart des tests appliqués au cours de ce travail sont ceux qui avaient été employés par Stanier et al. (Stanier et al. 1966) lors de leur étude du genre *Pseudomonas*. Diverses méthodes ont été décrites dans un mémoire antérieur (Pichinoty et al. 1977b).

La nutrition a été étudiée en tubes à essais contenant 7 ml de milieu. La concentration de l'aliment carboné est de 0.2%. Les souches auxotrophes sont cultivées en présence de 0.01% d'extrait de levure (Difco). On observe la croissance après 7 jours d'incubation à 32°C.

Les flagelles ont été colorés par la technique de Rhodes (Rhodes 1958). Le poly- β -hydroxybutyrate a été recherché par coloration au noir soudan ainsi que par extraction au chloroforme bouillant et conversion en acide crotonique (Law et Slepecky 1961). Les cellules provenaient de cultures aérobies en milieu minimal carencé en azote (Stanier et al. 1966) contenant 0.2% de DL-3-hydroxybutyrate.

La croissance aux dépens de différents accepteurs d'électrons

TABLEAU 1. Hydrates de carbone, acides hexoniques et alcools utilisés par une fraction des souches seulement

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
D-Glucose	5	Toutes excepté 5872, R799, R783, 6819 et 2127
D-Galactose	1	Toutes excepté R783
D-Mannose	5	Toutes excepté 5872, R799, R783, 6819 et 2127
Fructose	5	Toutes excepté 5872, R799, R783, 6819 et 2127
D-Glucosamine	1	Toutes excepté 6819
D-Gluconate	19	2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, R799, 6819, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 15173
D-Glucuronate	14	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 6230, R783, 5758, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2254, 6081, 15173
D-Saccharate	37	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
D-Arabinose	1	Toutes excepté 6819
D-Erythrose	16	4, 8, 9, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 24, 25, 5872, 6230, R799, R783, 5758, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1875, 2254, 6081, 2127, 15173
2-Céto-D-gluconate	2	Toutes excepté 4 et 6080
Glycérol	6	Toutes excepté 1, 5, 10, 22, 23 et 1875
Glycérate	30	14, 16, 18, 20, 25, 5872, 6230, R799, R783, 5758, E634, 2681, 2254
1,2-Éthanediol	1	Toutes excepté 6080
2,3-Butanediol	1	Toutes excepté 16
Ethanol	38	4, 6230, R799, 6080, 1885
Propanol	37	4, 7, 9, 17, 1885, 6081
Butanol	20	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 24, 25, 6075, E634, 2681, 6723, 6080, 1885, 1875, 2254, 2127
Isobutanol	2	Toutes excepté 6 et 5758

TABLEAU 2. Mono- et di-acides haliphatiques utilisés par une fraction des souches seulement

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
Acétate	42	E634
Propionate	17	Toutes excepté 2, 11, 15, 17, 24, 25, 5758, 6075, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2254, 6081, 2127 et 15173
Butyrate	40	E634, 2681, 2746
Isobutyrate	22	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 14, 19, 25, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 6075, E634, 2681, 2746, 1885, 1875
Valérate	29	7, 12, 13, 22, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 5758, 6075, E634, 2681, 2746
Isovalérate	8	Toutes excepté 10, 24, 6080, 1885, 1875, 2254, 6081 et 2127
Caproate	4	Toutes excepté 3, 4, 5 et 1885
Pélargonate	6	Toutes excepté 6, R799, R783, 6819, 1875 et 2127
Caprate	8	Toutes excepté 1, R799, R783, 6819, 2746, 1885, 1875 et 2254
Malonate	12	Toutes excepté 4, 9, 21, 24, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885 et 1875
Glutarate	38	6075, E634, 2746, 6723, 6080
Adipate	37	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Pimélate	37	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Subérate	36	4, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Azélaïdate	36	4, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Sébacate	36	9, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080

(KNO₃, 0.5%; KNO₂, 0.1%; K₂S₄O₆, 0.2%; Na₂S₂O₃, 0.2%; ou N₂O, 100% dans la phase gazeuse) a été étudiée en ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Celui-ci contient 0.4% d'extrait de levure (Difco). Le vide est fait avec une pompe.

Spectres cytochromiques

Les cultures aérobies ont été faites en fioles à toxine agitées dans un milieu contenant 0.4% d'extrait de levure (Difco). Les cultures anaérobies ont été faites en ballons sous vide dans un

milieu contenant 0.4% d'extrait de levure et 0.5% de KNO₃ ou 0.1% de KNO₂.

Les spectres cytochromiques différentiels ont été exécutés à la température de l'azote liquide avec un spectrophotomètre Cary 15 muni de cuves en Plexiglas ayant un trajet optique de 3 mm. L'une des cuves contient les cellules additionnées d'hydro-sulfite de sodium. La cuve témoin contient la même suspension additionnée de H₂O₂. Nous avons également effectué des spectres sur les cellules à la température ambiante en présence

TABLEAU 3. Divers acides haliphatiques ou aromatiques utilisés par une fraction des souches seulement

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
Glycolate	8	Toutes excepté 4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885 et 1875
β -Hydroxy- β -méthylglutarate	36	4, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
D-Malate	36	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1875
d-Tartrate	20	1, 2, 4, 6, 7, 13, 14, 17, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2127, 15173
l-Tartrate	15	Toutes excepté 10, 12, 13, 17, 21, 24, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 5758, 6075, 6081 et 2127
mésio-Tartrate	37	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Mucate	29	1, 2, 3, 4, 6, 14, 22, 23, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Maléate	29	4, 25, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 5758, 6075, 1885, 1875, 2254, 6081
Itaconate	37	4, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
trans-Aconitate	13	Toutes excepté 6, 8, 14, 19, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 6075, 1885, 1875 et 2127
cis-Aconitate	42	13
Mésaconate	36	4, 9, E634, 2681, 2746, 6723, 6080
Citraconate	40	4, 19, E634
Crotonate	24	4, 19, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 5758, 6075, E634, 2681, 2746, 6080, 1885, 1875, 2254, 6081, 2127, 15173
Benzoate	2	Toutes excepté 1885 et 1875
p-Hydroxybenzoate	1	Toutes excepté 4
m-Hydroxybenzoate	24	1, 5, 8, 9, 11, 13, 17, 19, 25, 5872, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2254
Phtalate	2	Toutes excepté 5758 et 2254
Quinate	1	Toutes excepté 4
Nicotinate	14	Toutes excepté 9, 10, 12, 13, 17, 21, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 6075, 1885 et 2127
Hippurate	25	4, 6, 9, 10, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 6230, 5758, 6075, 6080, 1885, 6081
Anthranilate	5	Toutes excepté 6723, 1885, 2254, 2127 et 15173
Benzoylformate	1	Toutes excepté 6723
Kynurénate	1	Toutes excepté 1885
d-Pantothénate	34	4, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875

de CO. On ajoute dans ce cas de l'hydrosulfite dans les deux cuves en verre qui ont un trajet optique de 10 mm.

Composition en bases de l'ADN

L'ADN a été extrait des cellules cultivées en milieu complexe. La composition en bases a été calculée (Schildkraut et al. 1962) à partir de la densité de flottaison (Mandel et al. 1968).

Résultats

Caractères morphologiques

Les 43 souches sont morphologiquement semblables. Elles se présentent sous la forme de petits bâtonnets à Gram négatif, non sporulés et dépourvus de capsule. Les 25 souches isolées du sol et les souches de *A. denitrificans* et *A. faecalis* de collection sont mobiles et possèdent 4 à 10 flagelles péritriches. Les souches 2681, 2746, 6723 et 6080 de *A. odorans* sont mobiles et présentent une flagellation péritriche dégénérée, le nombre de flagelles variant de 1 à 5. Bien que quelques rares cellules possèdent un flagelle, *A. odorans* E634 a toujours été trouvé immobile. La disposition des flagelles de la souche 3 apparaît nettement sur la Fig. 1.

Sur agar nutritif les colonies de toutes les

souches sont convexes, circulaires, lisses, mi-translucides, non pigmentées et peuvent atteindre 5 mm de diamètre.

Nutrition carbonée

Les 67 composés suivants ne sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie par aucune des 43 souches: L-glucose, L-sorbose, D-fucose, L-fucosé, α -méthyl-D-glucoside, β -méthyl-D-glucoside, α -méthyl-D-galactoside, β -méthyl-D-galactoside, α -méthyl-D-mannoside, salicine, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-ribose, inosine, α -méthyl-D-xyloside, β -méthyl-D-xyloside, lactose, maltose, saccharose, cellobiose, mélibiose, tréhalose, arbutine, D-mélézitose, raffinose, amidon, inuline, D-mannitol, D-sorbitol, D-dulcitol, méso-érythritol, ribitol, D-arabitol, L-arabitol, 1,2-propanediol, méthanol, 2-phényléthanol, oxalate, tartronate, ortho-hydroxybenzoate, L-mandélate, D-mandélate, téréphtalate, cinnamate, para-aminobenzoate, phénylacétate, naphthalène, testostérone, dodécane, hexadécane, sarcosine, créatine, bétaïne, L-arginine, histamine, D-tryptophane, éthanolamine, tryptamine, monométhylamine, n-

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

Substrat	Nombre de souches positives	Souches négatives
Glycine	4	Toutes excepté 2746, 6723, 6080 et 1875
α-L-Alanine	42	1875
β-Alanine	26	1, 2, 4, 5, 9, 13, 6230, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 2254, 6081, 2127
DL-Valine	24	2, 5, 6, 8, 9, 22, 23, 25, 6230, R799, 5758, 6075, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2254, 15173
DL-Norvaline	4	Toutes excepté 12, 13, 6723 et 6080
L-Leucine	20	4, 7, 8, 9, 11, 13, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 6075, E634, 1885, 1875, 2254, 6081
L-Norleucine	17	Toutes excepté 5, 9, 10, 12, 13, 17, 21, 22, 24, 5758, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 6081 et 2127
L-Isoleucine	13	Toutes excepté 2, 9, 10, 12, 13, 17, 21, 23, 24, E634, 2681, 2746 et 6723
DL-Sérine	28	8, 12, 14, 16, 18, 19, 20, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885, 1875, 2127
DL-Thréonine	4	Toutes excepté 10, 17, 21 et 5758
DL-Méthionine	1	Toutes excepté 6723
DL-Aspartate	18	Toutes excepté 1, 5, 6, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 6080, 1885, 1875, 2254, 6081, 2127 et 15173
Asparagine	36	9, 10, 13, E634, 2681, 2746, 6723
L-Lysine	12	Toutes excepté 1, 2, 3, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21 et R783
DL-Ornithine	3	Toutes excepté 5, 18 et 15173
L-Citrulline	1	Toutes excepté 15
L-Histidine	21	2, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 25, 5758, 6075, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 2254
L-Phénylalanine	39	4, E634, 2681, 2746
L-Tyrosine	34	4, 5, 6, 8, 15, 16, 18, 5758, 6075
L-Proline	42	E634
L-Tryptophane	24	2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 1875, 5758, 6075
Acétamide	17	Toutes excepté 1, 6, 7, 8, 11, 14, 18, 19, 20, 6230, R799, 6819, 2681, 6080, 6081, 2127 et 15173
4-Amino- <i>n</i> -butyrate	35	5, 8, E634, 2681, 2746, 6723, 6080, 1885

butylamine, *n*-amylamine, benzylamine, DL-2-amino-*n*-butyrate, putrescine, spermine et géranol.

Les composés qui sont utilisés par une fraction des 43 souches seulement sont indiqués dans les Tableaux 1, 2, 3 et 4.

La souche 1885, considérée jusqu'ici comme un *A. denitrificans*, est en réalité un *A. faecalis*.

La souche 4 se distingue des 34 autres souches de *A. denitrificans* par son aptitude à utiliser le 2-céto-D-gluconate, le *para*-hydroxybenzoate et le quinate, ainsi que par son incapacité à utiliser le D-saccharate, l'adipate, le pimélate, le subérate, le β-hydroxy-β-méthylglutarate, le *méso*-tartrate, l'azélaïdate, l'itaconate et la L-phénylalanine. Les 34 autres souches de *A. denitrificans* utilisent comme sources de carbone et d'énergie les 25 composés suivants: D-saccharate, acétate, butyrate, succinate, glutarate, adipate, pimélate, subérate, citrate, DL-isocitrate, L-lactate, D-lactate, β-hydroxy-β-méthylglutarate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, *méso*-tartrate, azélaïdate, pyruvate, α-cétoglutarate, fumarate, itaconate, α-D-alanine, L-glutamate, L-phénylalanine et L-proline. Les

souches 5872, R799, R783, 6819 et 2127 utilisent trois hexoses: le D-glucose, le D-mannose et le fructose. L'érythrose est le seul hydrate de carbone qui soit utilisé par certaines souches isolées du sol.

Les 5 souches de *A. odorans* utilisent comme sources de carbone et d'énergie les 21 composés suivants: propanol, malonate, succinate, glycolate, citrate, DL-isocitrate, L-lactate, D-lactate, L-malate, DL-3-hydroxybutyrate, pyruvate, α-cétoglutarate, fumarate, maléate, *cis*-aconitate, α-L-alanine, α-D-alanine, L-norleucine, L-glutamate, L-tyrosine et L-tryptophane.

Les souches 5758, 6075 et 1885 de *A. faecalis* utilisent comme sources de carbone et d'énergie les 28 composés suivants: D-saccharate, acétate, propionate, butyrate, succinate, adipate, pimélate, citrate, DL-isocitrate, L-lactate, D-lactate, L-malate, D-malate, DL-3-hydroxybutyrate, *méso*-tartrate, pyruvate, α-cétoglutarate, fumarate, itaconate, *cis*-aconitate, mésaconate, citraconate, α-L-alanine, α-D-alanine, asparagine, L-glutamate, L-phénylalanine et L-proline.

Les 5 souches de *A. odorans* se distinguent des 34 souches de *A. denitrificans* (souche 4 non

TABLEAU 5. Origine des souches isolées, aliment carboné utilisé lors de l'isolement, teneurs en guanine + cytosine (G + C) exprimées en moles pour cent et numéros d'inscription à la Collection de l'Institut Pasteur

Souche	Origine	Aliment carboné	G + C	Numéros d'inscription
1	Marseille	L-Malate	66	CIP 73-75
2	Marseille	Succinate	67	CIP 76-75
3	Marseille	Tartrate	67	CIP 75-75
4	Marseille	Succinate	66	CIP 84-75
5	Marseille	Succinate	67	CIP 101-75
6	Marseille	Succinate	67	CIP 106-75
7	Marseille	Succinate	65	CIP 81-75
8	Marseille	L-Malate	66	CIP 110-75
9	Marseille	Tartrate	65	CIP 111-75
10	Marseille	Tartrate	65	CIP 112-75
11	Marseille	Adipate	67	CIP 303-75
12	Marseille	Succinate	65	CIP 102-75
13	Marseille	Succinate	64.3	CIP 103-75
14	Marseille	Itaconate	66	CIP 328-75
15	Marseille	Adipate	68	CIP 318-75
16	Marseille	Adipate	67	CIP 329-75
17	Marseille	Itaconate	65	CIP 327-75
18	Marseille	Adipate	67	CIP 316-75
19	Marseille	Adipate	66	CIP 326-75
20	Marseille	Adipate	67	CIP 317-75
21	Marseille	Adipate	65	CIP 302-75
22	Marseille	L-Malate	67	CIP R891
23	Marseille	L-Malate	67	CIP R892
24	Sénégal	Adipate	65.3	CIP 289-75
25	Mali	Succinate	67	CIP 288-75

comprise) par leur incapacité d'utiliser le D-saccharate, l'adipate, le pimélate, le subérate, le β -hydroxy- β -méthylglutarate, le méso-tartrate, l'azélaïdate et l'itaconate.

Les souches suivantes sont auxotrophes: 9, 10, 12, 13, 17, 21, 24, 6081, 2127, 5758 et 6075.

Caractères biochimiques et physiologiques

Les 43 souches présentent des inclusions de poly- β -hydroxybutyrate. Par contre seules les souches 2, 3 et 13 utilisent ce composé comme source de carbone et d'énergie lorsqu'il est ajouté au milieu de culture.

Toutes les souches croissent en bouillon peptoné. Les cultures sont denses, homogènes et ne présentent pas de pellicule en leur surface. Seules les souches 1875 et 1885 ne croissent pas en bouillon peptoné contenant 3% de NaCl. Seules les souches 1875, 1885, 2254, 2127 et 15173 ne croissent pas en bouillon peptoné contenant 6% de NaCl. Seules les souches prototrophes 15173, 6080, E634, 2681, 2746 et 6723 n'assimilent pas le nitrate. Nous n'avons pas pu déterminer ce caractère chez les souches auxotrophes. Toutes les souches isolées du sol et les *A. denitrificans* de collection croissent, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . Ces composés sont vigoureusement déni-

TABLEAU 6. Teneurs en guanine + cytosine (G + C) exprimées en moles pour cent et numéros d'inscription à la Collection de l'Institut Pasteur des souches de collection

Souche	G + C		Numéros d'inscription
	ADN principal	Bande-satellite	
2254	68.7	58.2	CIP R931
6081	65.3	58.2	CIP 6081
2127	67.8		CIP R930
1875	64.3		CIP R928
5872	67.3		CIP 5872
6230	67.3		CIP 6230
R799	67.3		CIP R799
R783	67.3		CIP R783
6819	67.3		CIP 6819
15173	67.3	52	CIP 7715
6080	56.1		CIP 6080
E634	56.1		CIP R545
2681	56.1		CIP R546
2746	56.6		CIP R547
6723	55.6		CIP 6723
1885	64.3	60.2	CIP R929
6075	64.3		CIP 6075
5758	64.3		CIP 5758

trifiés. Les souches 1885, 5758 et 6075 ne croissent pas, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Les 5 souches de *A. odorans* utilisent, en anaérobiose, le nitrite, l'oxyde nitreux et le tétrathionate comme accepteurs d'électrons. Mais aucune d'elles n'est capable de croître dans ces conditions aux dépens du nitrate. Tous les *A. denitrificans* de collection et 24 souches isolées du sol peuvent croître, en anaérobiose, en présence de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$. Ce composé est réduit en thio-sulfate que l'on peut doser par iodométrie. La souche 4 par contre est dépourvue de tétrathionate-réductase. En anaérobiose et en présence de NO_3^- , les souches suivantes synthétisent la nitrate-réductase A (Pichinoty et Piéchaud 1968) à un niveau élevé: 1875, 2254, 6081, 2127, 15173, 5872, 6230, R799, R783, 6819, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 et 25. En aérobie et en l'absence de NO_3^- , les souches suivantes synthétisent la nitrate-réductase B (Pichinoty et Piéchaud 1968): 1875, 2254, 6081, 6075, 6230, R799, 6819, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 24 et 25. Les deux nitrate-réductases sont absentes chez les souches 1885, 5758, 6080, E634, 2681, 2746 et 6723. La nitrite-réductase respiratoire (Miyata et Mori 1968) est présente chez les *A. denitrificans* de collection, les *A. odorans* et les souches isolées du sol.

L'uréase est présente seulement chez les souches 8, 1875 et 1885. Seule la souche 1885 hydrolyse le 'Tween 80.' Aucune souche ne liquéfie la géla-

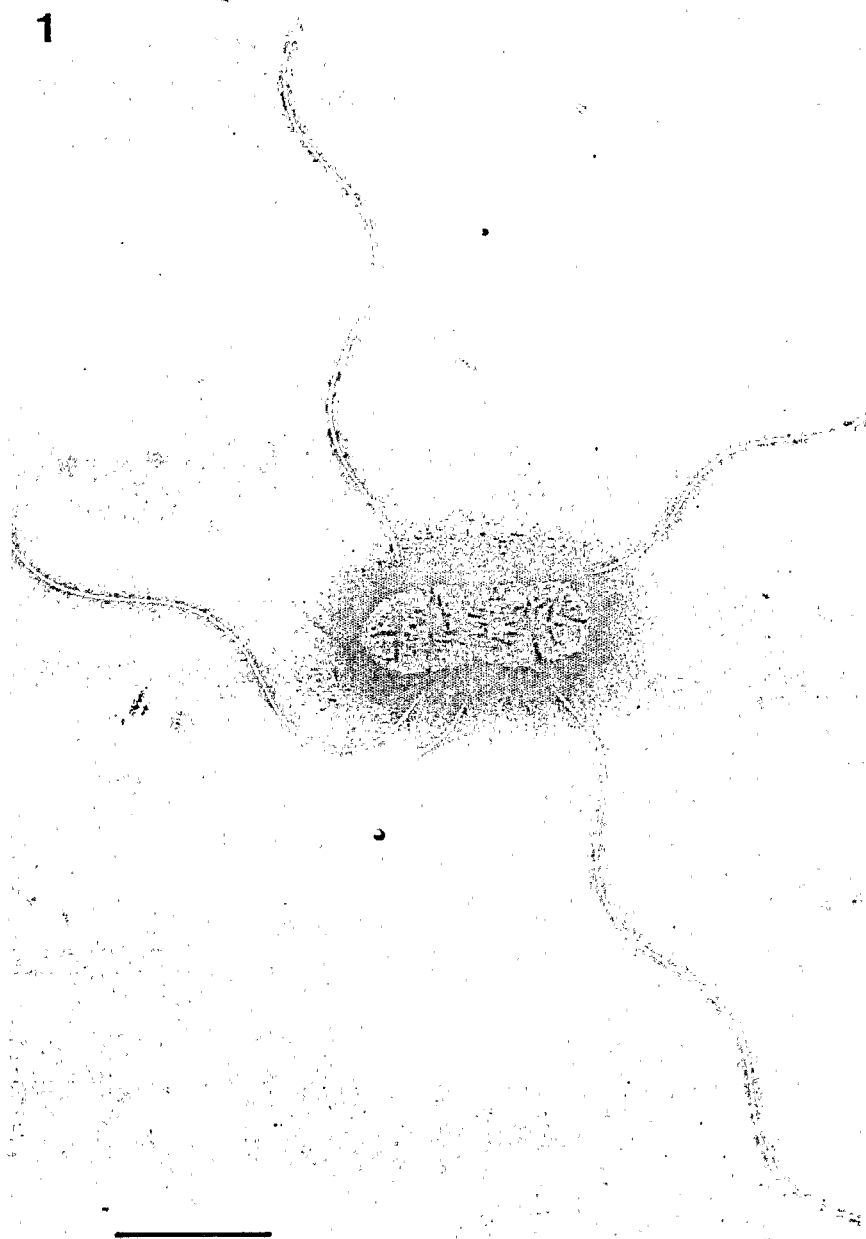


FIG. 1. Etude au microscope électronique de la souche 3. Coloration négative montrant les flagelles et l'aspect gaufré de la cellule. $\times 20\,000$. Le trait noir correspond à $1\ \mu\text{m}$.

tine, ne possède d'amylase exocellulaire, de L-phénylalanine-désaminase et d'arginine-dihydrolyase constitutive.

La souche 4 réalise une scission *méta* du protocatéchuate au cours de la dégradation du *para*-hydroxybenzoate et du quinate. Les souches 1875 et 1885 réalisent une scission *ortho* du caté-

chol au cours de la dégradation du benzoate (Stannier et al. 1966).

Seules les souches 12 et 13 croissent à 4°C . Seules les souches 4, 24, 25, 6080, 1885, 2254, 6081, 15173, 5872, 6230, R799 et 6819 croissent à 40°C .

Toutes les souches sont oxydase-positives, possèdent la catalase et un cytochrome de type *c*.

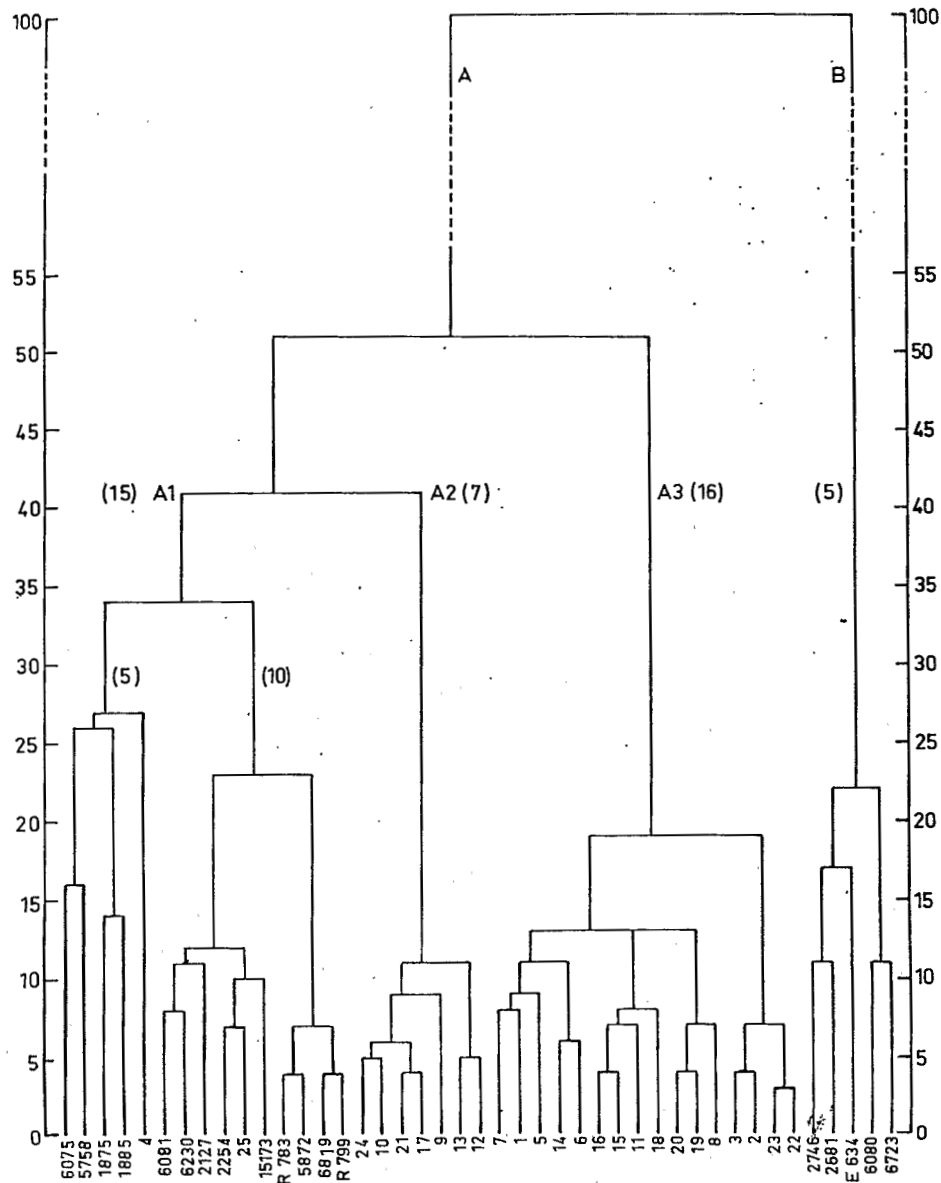


FIG. 2. Dendrogramme.

La croissance dans les conditions chimio-lithotrophes des 32 souches prototrophes a été étudiée, à 32°C, sur milieu minéral solide de Doudoroff (Stanier et al. 1966) en jarres anaérobies remplies d'un mélange gazeux contenant 65% de H₂, 5% de CO₂, 24% de N₂ et 6% de O₂ (ou N₂O). Les résultats ont toujours été négatifs même après 15 jours d'incubation.

Spectres cytochromiques

Les différentes composantes cytochromiques de la chaîne respiratoire de l'oxygène ont été identifiées sur des cellules cultivées en aérobiose.

Nous avons examiné les souches suivantes: 1, 4, 7 et 16; *A. denitrificans* 6230, 15173 et R799; *A. odorans* E634, 2681 et 2746; *A. faecalis* 1885, 5758 et 6075. L'oxydase $a + a_3$ n'a pas pu être mise en évidence chez les souches 4 et 1885. Cependant d'une façon générale deux oxydases sont présentes: $a + a_3$ dont le pic d'absorption dans le visible à la température de l'azote liquide se situe à 600–605 nm, et le 'carbon monoxide binding pigment' (ou cytochrome *o*) dont le pic de Soret en présence de CO se trouve à 417–421 nm. Toutefois des doutes subsistent quant à l'identité réelle de ce cytochrome *o* car il n'a pas été caractérisé par son

TABLEAU 7. *Alcaligenes denitrificans*. Caractères d'une grande valeur différentielle permettant de reconnaître *A. denitrificans*

Caractères	Nombre de souches positives	Phénotype idéal
1. Production de poly-β-hydroxybutyrate	35	+
2. Utilisation de NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ et N ₂ O comme accepteurs d'électrons	35	+
3. Utilisation de S ₄ O ₆ ²⁻ comme accepteur d'électrons	34	+
Utilisation de:		
4. D-Saccharate	34	+
5. Acétate	35	+
6. Butyrate	35	+
7. Succinate	35	+
8. Glutarate	35	+
9. Adipate	34	+
10. Pimélate	34	+
11. Subérate	34	+
12. Citrate	35	+
13. DL-Isocitrate	35	+
14. DL-Lactate	35	+
15. β-Hydroxy-β-méthylglutarate	34	+
16. L-Malate	35	+
17. DL-3-Hydroxybutyrate	35	+
18. méso-Tartrate	34	+
19. Azélaïdate	34	+
20. Pyruvate	35	+
21. α-Cétoglutarate	35	+
22. Fumarate	35	+
23. Itaconate	34	+
24. α-D-Alanine	35	+
25. L-Glutamate	35	+
26. L-Phénylalanine	34	+
27. L-Proline	35	+

TABLEAU 8. *Alcaligenes odorans*. Caractères d'une grande valeur différentielle permettant de reconnaître *A. odorans*

Caractères	Nombre de souches positives	Phénotype idéal
1. Production de poly-β-hydroxybutyrate	5	+
2. Utilisation de NO ₃ ⁻ comme accepteur d'électrons	0	-
3. Utilisation de NO ₂ ⁻ , N ₂ O et S ₄ O ₆ ²⁻ comme accepteurs d'électrons	5	+
Utilisation de:		
4. D-Saccharate	0	-
5. Propanol	5	+
6. Malonate	5	+
7. Succinate	5	+
8. Adipate	0	-
9. Pimélate	0	-
10. Subérate	0	-
11. Glycolate	5	+
12. Citrate	5	+
13. DL-Isocitrate	5	+
14. DL-Lactate	5	+
15. β-Hydroxy-β-méthylglutarate	0	-
16. L-Malate	5	+
17. DL-3-Hydroxybutyrate	5	+
18. méso-Tartrate	0	-
19. Azélaïdate	0	-
20. Pyruvate	5	+
21. α-Cétoglutarate	5	+
22. Fumarate	5	+
23. Maléate	5	+
24. cis-Aconitate	5	+
25. Itaconate	0	-
26. α-L-Alanine	5	+
27. α-D-Alanine	5	+
28. L-Norleucine	5	+
29. L-Glutamate	5	+
30. L-Tyrosine	5	+
31. L-Tryptophane	5	+

spectre d'action photochimique (Lemberg et Barrett 1973). On observe aussi la présence d'un cytochrome *c* et d'un ou deux cytochromes *b*.

Nous avons examiné des cellules des souches 1, 4, 7 et 16, des souches R799, 6230 et 15173 d'*A. denitrificans* et des souches E634, 2746 et 2681 d'*A. odorans*, cultivées en anaérobiose en présence de NO₃⁻ (ou de NO₂⁻ dans le cas des *A. odorans*). Les cytochromes *b* et *c*, ainsi que l'oxydase *o* sont présents. Par contre l'oxydase *a* + *a*₃ est absente.

Réduction des oxydes de l'azote

Nous avons utilisé la souche 1. Les suspensions cellulaires provenant de cultures anaérobies en milieu contenant NO₃⁻ ou N₂O, réduisent NO₃⁻ et NO₂⁻ en N₂O et N₂ sans accumuler NO; elles produisent aussi N₂O à partir de NO et réduisent quantitativement N₂O en N₂.

Génotype

La teneur de l'ADN en guanine + cytosine ex-

primée en moles pour cent est mentionnée dans les Tableaux 5 et 6. Une bande satellite apparaît chez 4 souches de collection. A l'aide de la technique de dénaturation technique, le Dr. Michel Popoff (Institut Pasteur) a trouvé la valeur 67.4% pour la souche 15173. La moyenne des valeurs trouvées est la suivante: 25 souches isolées du sol, 66.4 ± 1.1; 10 souches de *A. denitrificans*, 67.0 ± 1.3; 5 souches de *A. odorans*, 56.1 ± 0.4; 3 souches de *A. faecalis*, 64.3 ± 0.0.

Etude taxonomique

Les caractères étudiés ont produit, pour chaque souche, 198 résultats codés de façon binaire (1 = présent ou positif; 0 = absent ou négatif). La distance taxonomique a été calculée d'après la formule de Sneath-Jaccard (Sneath et Sokal 1973) soit $D = U/(S + U)$, où *U* est le nombre de paires de caractères différents (1-0 ou 0-1) et *S* le nombre

de paires de caractères présents ou positifs (1-1). La classification hiérarchique a été réalisée par la méthode d'agrégation selon la variance, et les classes ont été déterminées selon les méthodes décrites antérieurement (Véron et Le Minor 1975).

Les 43 souches étudiées se répartissent nettement en deux groupes distincts (Fig. 2). Le groupe A est constitué des 13 souches d'*A. faecalis* et *A. denitrificans* de collection, et des 25 souches isolées du sol; le groupe B rassemble les 5 souches d'*A. odorans*. Par l'étude des valeurs maximales du coefficient d'acuité, on peut découper la classe A en trois sous-classes, dont la composition est la suivante (Fig. 2): classe A1, 15 souches dont les 13 souches de collection désignées *A. faecalis* et *A. denitrificans*; classe A2, 7 souches isolées du sol; classe A3, 16 souches isolées du sol.

Notre travail permet de différencier nettement les espèces *A. denitrificans* et *A. odorans*, et de définir le phénotype idéal pour chacune d'elles (Tableaux 7 et 8).

Discussion

Alcaligenes denitrificans était considéré jusqu'ici comme une bactérie 'non saccharolytique,' autrement dit incapable de dégrader les hydrates de carbone (Hendrick et al. 1974; Holding et Shewan 1974; Pickett et Pedersen 1970; Tatum et al. 1974). Or 5 souches isolées de spécimens cliniques utilisent trois hexoses comme aliments carbonés.

Rarick et al. (Rarick et al. 1977) ont signalé dans une brève note que le malate, l'adipate et le pimélate étaient utilisés par *A. denitrificans* et *A. faecalis*, mais non par *A. odorans*, et que la méthionine était utilisée seulement par *A. odorans*. Nos observations rejoignent celles de ces auteurs en ce qui concerne l'adipate et le pimélate. Par contre nos 5 souches d'*A. odorans* utilisent le L-malate et une seule utilise la méthionine. Les 7 souches d'*A. odorans* étudiées par Pickett et Pedersen (Pickett et Pedersen 1970) étaient également incapables de croître aux dépens de l'adipate et du saccharate. L'étude la plus étendue a été réalisée par Gilardi (Gilardi 1973) qui a examiné 8 souches d'*A. denitrificans*, 5 souches d'*A. faecalis* et 31 souches d'*A. odorans*. Le succinate, le fumarate, le D-malate, le DL-lactate, le citrate, le pyruvate et le L-glutamate sont utilisés par les 44 souches. Le pèlargonate, la L-arginine, la DL-norleucine et la DL-sérine ne sont utilisés par aucune d'elles. Le malonate et la glycine sont utilisés seulement par les souches d'*A. denitrificans* et *A. odorans*. Enfin l'acétamide et la DL-méthionine ne sont utilisés que par les souches d'*A. odorans*.

Les souches étudiées produisent toutes des poly-

β -hydroxybutyrate lorsqu'elles croissent dans un milieu minimal carencé en azote contenant du DL-3-hydroxybutyrate. Les observations négatives de Gilardi (Gilardi 1973) s'expliquent sans doute par la composition du milieu employé ou (et) par la faible sensibilité de la technique cytologique. Cette substance de réserve est également synthétisée par les espèces chimio-lithotrophes *A. eutrophus* et *A. paradoxa* (Davis et al. 1969).

Les 25 bactéries isolées du sol appartiennent à l'espèce *A. denitrificans*. La souche 4 est atypique. Elle se différencie des 34 autres souches par son aptitude à utiliser le 2-céto-D-gluconate, le parahydroxybenzoate et le quinate, par son incapacité à utiliser le D-saccharate, l'adipate, le pimélate, le subérate, le β -hydroxy- β -méthylglutarate, le méso-tartrate, l'azélaïdate, l'itaconate et la L-phénylalanine, par son aptitude à réaliser une scission *méto* des diphenols et par l'absence de tétrathionate-réductase. Cependant son G + C pour cent est très proche de la valeur moyenne.

Les 5 souches d'*A. odorans* se distinguent des 34 souches d'*A. denitrificans* (souche 4 non comprise) par leur incapacité à dénitrifier le nitrate et à utiliser le D-saccharate, l'adipate, le pimélate, le subérate, le β -hydroxy- β -méthylglutarate, le méso-tartrate, l'azélaïdate et l'itaconate. Il est très proche de son G + C pour cent d'*A. odorans* est nettement plus faible que celui d'*A. denitrificans*. Nos valeurs sont en bon accord avec celles obtenues par De Ley et al. (De Ley et al. 1970) qui ont utilisé la technique de dénaturation thermique: *A. odorans* (23 souches), 57.8 ± 0.7 ; *A. denitrificans* (5 souches), 68 ± 1.9 . La souche type (NCTC 10416) d'*A. odorans* et la souche type (NCTC 10388) d'*A. odorans* var. *viridans* (Gilardi et Hirschl 1969; Mitchell et Clarke 1965) ont été trouvées identiques (Tatum et al. 1974). Il serait donc judicieux d'abandonner l'épithète *viridans*.

Le nombre de souches d'*A. faecalis* est trop faible pour qu'il soit possible de tirer une conclusion taxonomique. Cette espèce est tout cas plus proche d'*A. denitrificans* que d'*A. odorans*. Les trois souches examinées se différencient d'*A. denitrificans* par leur incapacité de croître, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O et $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, ainsi que par un G + C pour cent légèrement plus faible.

Le fait que *A. denitrificans* soit sélectionné avec une fréquence élevée dans nos cultures d'enrichissement montre que cette espèce est ubiquitaire dans le sol. Elle joue sans doute, dans la dénitrification et la dégradation des composés organiques, un rôle écologique aussi important que les pseudomo-

nades. Notre travail met une nouvelle fois en lumière les étroits liens de parenté existant entre les genres *Pseudomonas* et *Alcaligenes* ou *Agrobacterium* (Pichinoty et al. 1977a) dont la différenciation repose exclusivement sur le mode d'insertion des flagelles.

Remerciements

Nous exprimons notre gratitude à Mme A. Ryter (Institut Pasteur, Paris) qui a exécuté le cliché au microscope électronique et au Dr. R. Y. Stanier (Institut Pasteur, Paris) qui a manifesté de l'intérêt pour ce travail. Nous remercions le Dr. G. L. Gilardi (Department of Laboratories, Hospital for Joint Diseases and Medical Center, New York) et le Dr. M. Piéchaud (Institut Pasteur, Paris) pour les souches qu'ils nous ont fait parvenir. Les échanges de vues que nous avons eus avec le Dr. M. Popoff (Institut Pasteur, Paris) nous ont été précieux au cours de la réalisation de ce travail.

- CHATELAIN, R. 1969. Réduction des nitrites par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 116: 498-500.
- DAVIS, D. H., M. DOUDOROFF et R. Y. STANIER. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. Int. J. Syst. Bacteriol. 19: 375-390.
- DE LEY, J., K. KERSTERS, J. KHAN-MATSUBARA et J. M. SHEWAN. 1970. Comparative D-gluconate metabolism and DNA base composition in *Achromobacter* and *Alcaligenes*. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 36: 193-207.
- GILARDI, G. L. 1971. Characterization of nonfermentative nonfastidious Gram negative bacteria encountered in medical bacteriology. J. Appl. Bact. 34: 623-644.
- . 1973. Nonfermentative Gram-negative bacteria encountered in clinical specimens. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 39: 229-242.
- GILARDI, G. L., et S. HIRSCHL. 1969. Morphological and biochemical characterization of *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. Int. J. Syst. Bacteriol. 19: 167-171.
- HENDRIE, M. S., A. J. HOLDING et J. M. SHEWAN. 1974. Emended descriptions of the genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that the generic name *Achromobacter* be rejected: status of the named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. 24: 534-550.
- HOLDING, A. J., et J. M. SHEWAN. 1974. Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 1936. In Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Editeurs: R. E. Buchanan et N. E. Gibbons. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. pp. 273-275.
- LAW, J. H., et R. A. SLEPECKY. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82: 33-36.
- LEIFSON, E., et R. HUGH. 1954. *Alcaligenes denitrificans* n. sp. J. Gen. Microbiol. II: 512-513.
- LEMBERG, R., et J. BARRETT. 1973. Bacterial cytochromes and cytochrome oxidases. In Cytochromes. Academic Press, Inc., New York. pp. 217-326.
- MÁLEK, I., M. RADOCHOVÁ et O. LYSENKO. 1963. Taxonomy of the species *Pseudomonas odorans*. J. Gen. Microbiol. 33: 349-355.
- MANDEL, M., C. L. SCHILDKRAUT et J. MARMUR. 1968. Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In Methods in enzymology. Vol. 12B. Editeurs: S. P. Colowick et N. O. Kaplan. Academic Press, Inc., New York. pp. 184-195.
- MITCHELL, R. G., et S. K. R. CLARKE. 1965. An *Alcaligenes* species with distinctive properties isolated from human sources. J. Gen. Microbiol. 40: 343-348.
- MİYATA, M., et T. MORI. 1968. Studies on denitrification. VIII. Production of nitric oxide by denitrifying reaction in the presence of tetramethyl-*p*-phenylenediamine. J. Biochem. 64: 849-861.
- PICHINOTY, F., M. MANDEL et J.-L. GARCIA. 1977a. Etude de six souches de *Agrobacterium tumefaciens* et *A. radiobacter*. Ann. Microbiol. (Paris) 128A: 303-310.
- 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. Ser. D, 281: 1273-1275.
- . 1977b. Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe *Pseudomonas stutzeri* isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. Ann. Microbiol. (Paris) 128A: 75-87.
- . 1977c. Isolation and properties of a denitrifying bacterium related to *Pseudomonas lemoignei*. Int. J. Syst. Bacteriol. 27: 346-348.
- PICHINOTY, F., et M. PIÉCHAUD. 1968. Recherche des nitratreductases bactériennes A et B: méthodes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 114: 77-98.
- PICKETT, M. J., et M. M. PEDERSEN. 1970. Salient features of nonsaccharolytic and weakly saccharolytic nonfermentative rods. Can. J. Microbiol. 16: 401-409.
- RARICK, H. R., P. S. RILEY et R. E. WEAVER. 1977. Determination of carbon substrate utilization patterns of some *Alcaligenes* species with the multiple inocula (replicator) technique. In Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. 77th Annual Meeting, New Orleans. p. 51.
- RHODES, M. E. 1958. The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. J. Gen. Microbiol. 18: 639-648.
- SCHILDKRAUT, C. L., J. MARMUR et P. DOTY. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4: 430-433.
- SNEATH, P. H. A., et R. R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London.
- STANIER, R. Y., N. J. PALLERONI et M. DOUDOROFF. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43: 159-271.
- TATUM, H. W., W. H. EWING et R. E. WEAVER. 1974. Miscellaneous Gram-negative bacteria. In Manual of clinical microbiology. 2nd ed. Editeurs: E. H. Lennette, E. H. Spaulding et J. P. Truant. Am. Soc. Microbiol., Washington. pp. 270-294.
- THIBAUT, P. 1961. A propos d'*Alcaligenes faecalis*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 100: 59-73.
- VÉRON, M., et L. LE MINOR. 1975. Nutrition et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bactéries voisines. II. Résultats d'ensemble et classification. Ann. Microbiol. (Paris) 126B: 111-124.