

La biosynthèse des enzymes de la dénitrification chez cinq bactéries dénitrifiantes

Jean-Louis GARCIA
Microbiologiste ORSTOM
Laboratoire de Microbiologie du sol,
ORSTOM, B. P. 1386, Dakar, Sénégal

Résumé

Les activités des différentes enzymes de la dénitrification ont été mesurées sur des extraits provenant de cultures aérobies sans nitrate et anaérobies avec nitrate ou N_2O , de quatre bactéries dénitrifiantes mésophiles et d'une bactérie thermophile récemment isolées du sol. Ces enzymes sont souvent synthétisées en aérobiose à un faible niveau, en l'absence d'inducteur. L'une des souches étudiées a présenté une croissance positive avec NO comme substrat respiratoire ; ce gaz a induit toutes les enzymes de la dénitrification. L'activité N_2O -réductase des bactéries mésophiles a été estimée en présence de chloramphénicol, sur les cellules d'une culture aérobie sans nitrate.

Mots-clés : Dénitrification - Biosynthèse - Enzymes - Bactéries.

Abstract

SYNTHESIS OF DENITRIFYING ENZYMES IN FIVE DENITRIFYING BACTERIA

Denitrifying enzymes activities were measured in crude extracts from cells grown in aerobic conditions without nitrate or grown with nitrate or nitrous oxide in anaerobic conditions, for 4 mesophilic and 1 thermophilic denitrifying bacteria recently isolated from soil. These enzymes were often synthesized without inductor in aerobic conditions at a low level. One of the strains studied could grown anaerobically with nitric oxide as the terminal electron acceptor ; this gas has induced all the denitrifying enzymes. Nitrous oxide reductase activity of mesophilic bacteria was estimated in the presence of chloramphenicol in washed cell suspension from growth in aerobic conditions.

Key words : Denitrification - Biosynthesis - Enzymes - Bacteria.

INTRODUCTION

La biosynthèse des enzymes de la dénitrification est induite simultanément par tous les intermédiaires utilisés comme substrat respiratoire en l'absence d'oxygène (PAYNE, 1973). Chez *Pseudomonas perfectomarinus*, il n'y aurait qu'un gène régulateur qui peut être affecté par plusieurs inducteurs ; il est réprimé par O_2 (PAYNE, 1973).

De nombreux auteurs ont rapporté que l'anaérobiose et la présence d'inducteurs sont nécessaires à l'acquisition de l'activité dénitrifiante. Ainsi chez *Pseudomonas denitrificans* on observe une latence de plusieurs heures pour réduire N_2O en N_2 (DELWICHE, 1959). Chez *Paracoccus (Micrococcus) denitrificans*, les cellules sont dépourvues d'activité nitrate - ; nitrite - ; ou oxyde nitreux-réductase

lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose même en présence de NO_3^- ou N_2O (PICHINOTY et d'ORNANO, 1961). La nitrite-réductase est inductible et sa synthèse est réprimée par O_2 chez cette bactérie (PICHINOTY, 1969). L'oxygène exerce deux effets distincts et complémentaires : il réprime la formation des enzymes de la dénitrification et inhibe leur fonctionnement (PICHINOTY, 1965). Les enzymes de la dénitrification ne sont pas synthétisées dans les cellules de *P. perfectomarinus* cultivées en aérobiose puis placées en anaérobiose. Mais la synthèse a lieu dans ces conditions après addition de nitrate. Elle est simultanée et nécessite 40 minutes ; elle est maximum après 60 minutes (PAYNE *et coll.*, 1971). Chez *Alcaligenes faecalis* la nitrate-réductase qui est une hémoprotéine *cd*, n'est pas synthétisée en aérobiose (IWASAKI et MATSUBARA, 1971).

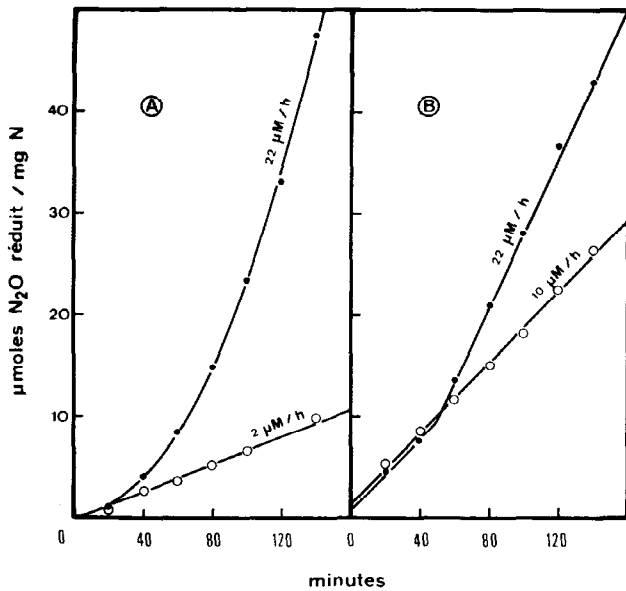


FIG. 1. - Réduction de N_2O par les cellules lavées provenant d'une culture aérobie sans nitrate. Milieu de culture, 25 ml ; suspension bactérienne, 1 ml ; krypton (étalon interne), 2 ml ; N_2O , 10 ml (10 % de la phase gazeuse) ; atmosphère, He pur ; incubation à 37° C dans bain-marie agité. (A) *Bacillus azotoformans* ; (B) *Flavobacterium* sp. ; o ----- o + chloramphénicol, 100 µg/ml. ● ----- ● sans chloramphénicol.

térie, même après culture anaérobie sur N_2O . La nitrite-réductase n'est pas constitutive chez *B. azotoformans* ainsi que la NO-réductase chez *Flavobacterium* sp. La N_2O -réductase est constitutive chez les bactéries étudiées : ainsi *B. azotoformans* et *Flavobacterium* sp. réduisent N_2O en présence de chlo-

ramphénicol après croissance aérobie sans nitrate (fig. 1). En l'absence de chloramphénicol, une synthèse de l'enzyme est observée ; elle est presque immédiate chez la première bactérie et ne démarre qu'après 50 mn d'incubation à 37° pour la seconde. Le surnageant à 4.000 g de l'extrait de la bactérie thermophile cultivée en aérobiose sans nitrate, réduit N_2O avec une vitesse voisine de celle obtenue avec un extrait d'une culture anaérobie sur nitrate. Enfin, toutes les enzymes de la dénitrification ont été induites lors de la croissance anaérobie de *Bacillus* sp. en utilisant NO comme substrat respiratoire ; cette croissance en présence de NO est un fait nouveau dans l'étude de la dénitrification compte tenu de la grande toxicité de ce gaz (PICHINOTY, GARCIA *et coll.*, 1978).

Les enzymes de la dénitrification, dont la biosynthèse est simultanément induite par tous les intermédiaires et réprimée par l'oxygène, sont donc également souvent synthétisées à un faible niveau en l'absence d'inducteur. Ce niveau dépend de l'aération du milieu de culture ; dans le cas des bactéries mésophiles étudiées, la culture a été effectuée dans une fiole à toxine sur une table d'agitation circulaire, avec la même vitesse de rotation pour toutes les cultures. Pour la bactérie thermophile, l'aération a été réalisée à 55°, par introduction forcée d'air comprimé dans le milieu ; mais malgré ce procédé, la teneur en O_2 du milieu de culture reste faible à cette température et se traduit par l'existence d'un niveau de base nettement plus élevé que pour les bactéries mésophiles, quelle que soit l'enzyme mesurée.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM, le 9 janvier 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- BALDENSPERGER (J.), GARCIA (J.-L.), 1975. - Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 103 : 31-36.
- DELWICHE (C.C.), 1959. - Production and utilization of nitrous oxide by *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.*, 77 : 55-59.
- 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.
- GARCIA (J.L.), 1977. - Etude de la dénitrification chez une bactérie thermophile sporulée. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 : 447-458.
- GAUTHIER (D.K.), CLARK-WALKER (G.D.), GARRARD (W.T.Jr.), LASCELLES (J.), 1970. - Nitrate reductase and soluble cytochrome c in *Spirillum itersonii*. *J. Bacteriol.*, 102 : 797-803.
- IWASAKI (H.), MATSUBARA (T.), 1971. - Cytochrome c-557 (551) and cytochrome cd of *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 69 : 847-857.
- KODAMA (T.), MORI (T.), 1969. - Comparative studies on aerobically and anaerobically grown cells of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri*. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 82 : 368-370.
- MATSUBARA (T.), 1971. - Studies on Denitrification. XIII. Some properties of the N_2O -anaerobically grown cell. *J. Biochem. (Tokyo)*, 69 : 991-1001.
- MIYATA (M.), MATSUBARA (T.), MORI (T.), 1969. - Studies on Denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. *J. Biochem. (Tokyo)*, 66 : 759-765.
- PAYNE (W.J.), 1973. - Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 37 : 409-452.

- PAYNE (W.J.), RILEY (P.S.), COX (C.D.Jr.), 1971. - Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bacteriol.*, 106 : 356-361.
- PICHINOTY (F.), 1965. - L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, 109 : 248-255.
- PICHINOTY (F.), 1969. - La dénitrification bactérienne. I. Utilisation des amines aromatiques comme donneuses d'électrons dans la réduction du nitrite. *Archiv. Microbiol.*, 69 : 314-329.
- PICHINOTY (F.), 1973. - La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur*, 71 : 317-395.
- PICHINOTY (F.), BIGLIARDI-ROUVIER (J.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), METENIER (G.), GARCIA (J.-L.), 1976. - The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42 : 349-354.
- PICHINOTY (F.), DE BARJAC (H.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1976. - Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : *Bacillus azotoformans* n. sp. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127 B : 351-361.
- PICHINOTY (F.), D'ORANO (L.), 1961. - Recherches sur la réduction du protoxyde d'azote par *Micrococcus denitrificans*. *Ann. Inst. Pasteur*, 101 : 418-426.
- PICHINOTY (F.), DURAND (M.), JOB (C.), MANDEL (M.), GARCIA (J.-L.), 1978. - Etude morphologique, physiologique et taxonomique de *Bacillus azotoformans*. *Can. J. Microbiol.*, 24 : 608-617.
- PICHINOTY (F.), GARCIA (J.-L.), MANDEL (M.), JOB (C.), DURAND (M.), 1978. - Isolement de bactéries utilisant en anaérobiose l'oxyde nitrique comme accepteur d'électrons respiratoire. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, sér. D. 286 : 1403-1405.
- PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GARCIA (J.-L.), 1979. - The properties of novel mesophilic denitrifying *Bacillus* culture found in tropical soil. *J. Gen. Microbiol.*, 155 : 419-430.
- PICHINOTY (F.), MANDEL (M.), GREENWAY (B.), GARCIA (J.-L.), 1975. - Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre *Alcaligenes*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* sér. D 281 : 1273-1276.
- PICHINOTY (F.), PIECHAUD (M.), 1968. - Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 114 : 77-98.