

Inhibition de la formation de méthane par l'acétylène chez *Méthanosarcina barkerii*

Maurice RAIMBAULT
Microbiologiste ORSTOM
Laboratoire de Microbiologie du Sol
ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

Résumé

M. barkerii a été cultivé sur un milieu contenant 8 g/l de méthanol comme substrat. Une culture de 20 litres de milieu a fourni 100 litres de gaz et 20 g de cellules après 5 jours avec un temps de doublement de 7 heures 30. 88 % du méthanol a ainsi servi à la production de gaz et 12 % à la production de biomasse. Les cellules récoltées et lavées ont servi à l'étude des activités des cellules et des extraits bruts. L'activité spécifique des cellules entières (1,9 $\mu\text{Moles CH}_4/\text{h/mg}$ protéine) est 30 fois plus élevée que celle des extraits. Les constantes K_m ont été calculées pour les cellules (11 $\mu\text{Moles CH}_3\text{OH/l}$) et pour les extraits (4,2 $\mu\text{Moles/l}$). Nous avons pu montrer également que la formation de CH_4 est inhibée par l'acétylène de façon non compétitive et donc indépendamment de la concentration en substrat. Le calcul des constantes d'inhibition a montré que l'action de l'acétylène est plus forte sur les cellules entières ($K_i = 15 \mu\text{Moles C}_2\text{H}_2/\text{l}$) que dans les extraits bruts ($K_i = 54 \mu\text{Moles/l}$).

Mots clés : *Methanosarcina barkerii* - Formation de méthane.

Summary

ACETYLENE INHIBITION OF CH_4 FORMATION BY *METHANOSARCINA BARKERII*

M. barkerii was grown on methanol (8 g/l). A 20 liters culture provided 100 liters of gas and 20 g of biomass after 5 days. Doubling time was 7,5 hours. 88 % of methanol was used for gas production and 12 % for biomass. Washed cells were used to measure cells and extracts activities. Specific activity of resting cells (1,9 $\mu\text{Moles CH}_4/\text{h/mg}$ protein) was more than extracts (0,1 $\mu\text{Moles CH}_4/\text{h/mg}$ protein). K_m constants for cells (11 $\mu\text{Moles CH}_3\text{OH/l}$) and extracts (4,2 $\mu\text{Moles/l}$) were calculated. Acetylene inhibition was shown non competitive and then independent of substrate concentration. Inhibition constants K_i for resting cells (15 $\mu\text{Moles C}_2\text{H}_2/\text{l}$) and extracts (54 $\mu\text{Moles/l}$) indicated a more intense inhibition of intact cells than extracts.

Key words : *Methanosarcina barkerii* - Methane formation.

INTRODUCTION

Lors d'une étude précédente, nous avons montré l'influence inhibitrice de l'acétylène sur la formation biologique de méthane dans des échantillons de sols de rizières et dans des cultures pures de bactéries méthanigènes (RAIMBAULT, 1975). Nous avons trouvé en particulier que la croissance de *Methanosarcina barkerii* totalement inhibée par une pression partielle de 0,01 atm. et que l'activité des cellules non proliférantes est réduite de 98 p. 100 par une

concentration de $0,5 \times 10^{-3}$ M d'acétylène dans le milieu.

L'acétylène est connu pour son inhibition compétitive du système nitrogénasique de la réduction de l'azote atmosphérique (HARDY *et al.*, 1968), mais il peut également inhiber la croissance de *Clostridium pasteurianum* même en présence d'ion ammonium (BRONZES et KNOWLES, 1971), donc agir sur un système enzymatique différent de la nitrogénase.

Nous nous proposons ici d'étudier le mécanisme de l'inhibition par l'acétylène de la formation de

CH₄ par des cellules entières et des extraits acellulaires de *M. barkerii* cultivé sur méthanol.

Peu d'études ont été faites sur les systèmes enzymatiques et les activités des extraits bruts de bactéries méthanigènes. (BLAYLOCK et STADTMAN, 1963, 1964 a et b, 1968, STADTMAN et BLAYLOCK, 1966) ont étudié le rôle des dérivés de la cyanocobalamine dans le transfert des groupements méthyl chez *M. barkerii*. WOLIN *et col.* (1963 a et b, 1964) ont également réalisé des études importantes sur la formation de CH₄ par des extraits de *Methanobacillus omelianskii*.

Dans une première étape nous avons donc réalisé une culture massive de *M. barkerii* sur méthanol de façon à étudier sa croissance et obtenir les quantités de cellules nécessaires aux études des activités des cellules entières et des extraits bruts en présence et en absence d'acétylène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

ORGANISME

Nous avons utilisé une bactérie méthano formatrice que nous avons isolée d'un sol de rizière du Sénégal (Djibelor). Il s'agit d'une sarcine pouvant utiliser le méthanol comme seul substrat carboné et dont les caractères sont semblables à ceux de la souche de *M. Barkerii* décrite par STADTMAN et BARKER, 1951.

MILIEU DE CULTURE

Nous avons utilisé un milieu proche de celui décrit par TOERIE et SIEBERT, 1967, pour entretenir les souches :

- solution I : K₂HPO₄ : 3 g/l.
- solution II : KH₂PO₄ : 3 g ; NaCl : 6g ; NH₄Cl : 6g ; MgCl₂.7H₂O : 0,6 g ; CaCl₂.2H₂O : 0,6 g ; CoCl₂.6H₂O : 0,2 g ; NaMoO₄.2H₂O : 0,15 g ; citrate de fer ammoniacal : 0,15 g pour 1 litre d'eau.
- solution d'acides organiques : acétate-Na : 4 g ; propionate-Na : 1 g ; succinate-Na : 1g ; lactate-Na : 1 g ; pyruvate-Na : 2 g ; acide butyrique : 1 g pour 100 ml d'eau.
- solution vitaminique : acide ascorbique : 50 mg ; riboflavine : 50 mg ; biotine : 100 mg ; pyridoxine-HCl : 100 mg ; acide folique : 20 mg ; acide p-aminobenzoïque : 100 mg ; acide nicotinique : 50 mg pour 100 ml d'eau. Le pH a été ajusté à 9,3 et la solution stérilisée par filtration.

Le milieu de culture est composé de 38 ml de solution I, 38 ml de solution II, 5 ml d'une solution de résazurine (0,4 g par litre de NaOH 0,01 N), 3,2 ml de solution d'acides organiques et 2 ml de solution vita-

minique par litre de milieu.

Après stérilisation l'oxygène est éliminé par gavage à l'azote préalablement débarrassé des traces d'oxygène par passage sur tournure de cuivre réduit et chauffé. Le méthanol (10 ml/litre) est alors ajouté, puis 17 ml/l d'une solution réductrice selon TOERIE et SIEBERG, 1967. Le pH est ajusté à 6,8 puis régulé automatiquement par addition de Na₂CO₃ (8 g/100 ml d'eau). Après décoloration complète du milieu on ajoute un inoculum de 10 p. cent (v/v) d'une préculture de 4 à 5 jours. Le gaz formé est recueilli dans un appareil permettant la mesure régulière du volume dégagé. Pendant la croissance la température du milieu a été maintenue à 39°.

PRÉPARATION DES CELLULES ENTIÈRES

Après 5 jours de culture les cellules sont récoltées par centrifugation. Le culot cellulaire est lavé deux fois dans un tampon phosphate 0,2 M, pH = 7 contenant 0,02 g de Na₂S.9H₂O pour 100 ml puis conservé au froid sous atmosphère d'hydrogène.

PRÉPARATION DES EXTRAITS ACELLULAIRES

Les cellules ont été remises en suspension dense dans le tampon phosphate + Na₂S et passées deux fois dans une cellule de FRENCH.

La suspension a été ensuite centrifugée et le surnageant utilisé comme extrait acellulaire brut. Les protéines ont été estimées par la méthode de Kjeldahl (N × 6,25).

MESURE DES ACTIVITÉS

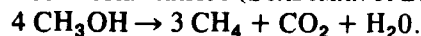
L'activité méthanigène a été mesurée dans des flacons de 13 cm³ munis d'un bouchon serum et d'une virole. Les flacons ont été gazés à l'azote, CO₂ ou hydrogène privés d'oxygène par passage sur une colonne de cuivre réduit et chaud. Les solutions et les réactifs ont été introduits à l'aide de seringues leur volume total étant de 3 ml. Les flacons ont alors été incubés dans un bain-marie à 39°C. A des intervalles de temps appropriés des échantillons gazeux ont été prélevés à la seringue et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. CROISSANCE DE *M. BARKERII* SUR MÉTHANOL

La souche de *M. barkerii* a été cultivée dans un fermenteur Biolaffitte contenant 20 litres de milieu soit 200 ml de méthanol de densité 0,8 donc 160 g de substrat (5 moles). La croissance a été estimée par la mesure du volume gazeux formé provenant de la réac-

tion dissimilatrice (STADTMAN et BARKER, 1951) :



selon laquelle 1 mole de substrat fournit 1 mole de gaz (fig. 1). Le volume gazeux porté sur une échelle 1/2 logarithmique (fig. 2) nous a permis de calculer un temps de doublement de 7 h 30. Ce résultat est inférieur à ceux généralement trouvés dans la littérature pour les bactéries méthanigènes dont les temps de doublement sont compris entre 12 et 48 heures excepté pour *Méthanobactérium thermoautotrophicus* dont la croissance est particulièrement rapide (3 - 5 heures).

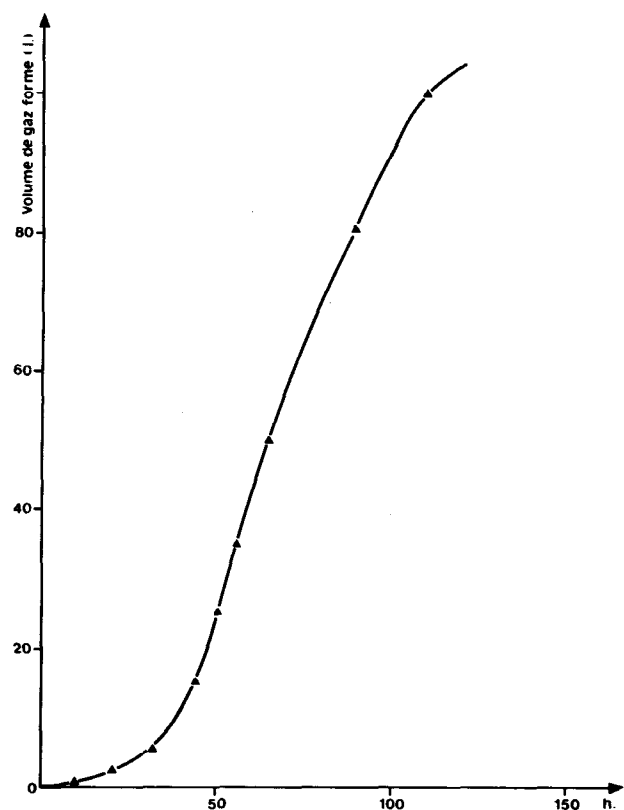


FIG 1 — Dégagement gazeux pendant la culture *M. barkerii* sur méthanol.

Selon l'équation stœchiométrique précédente, les 100 litres de gaz formé proviennent de 4,4 moles de méthanol soit 88 % du substrat disponible. La production de biomasse a été de 98 g de poids humide à 80 p.cent d'eau soit 19,5 g de poids sec, ce qui correspond à un rendement cellulaire de 12,2 % par rapport au substrat disponible. On peut donc estimer que lors de la croissance de *M. barkerii*, 88 % du méthanol a été utilisé pour la production de gaz et 12 % pour la production de biomasse.

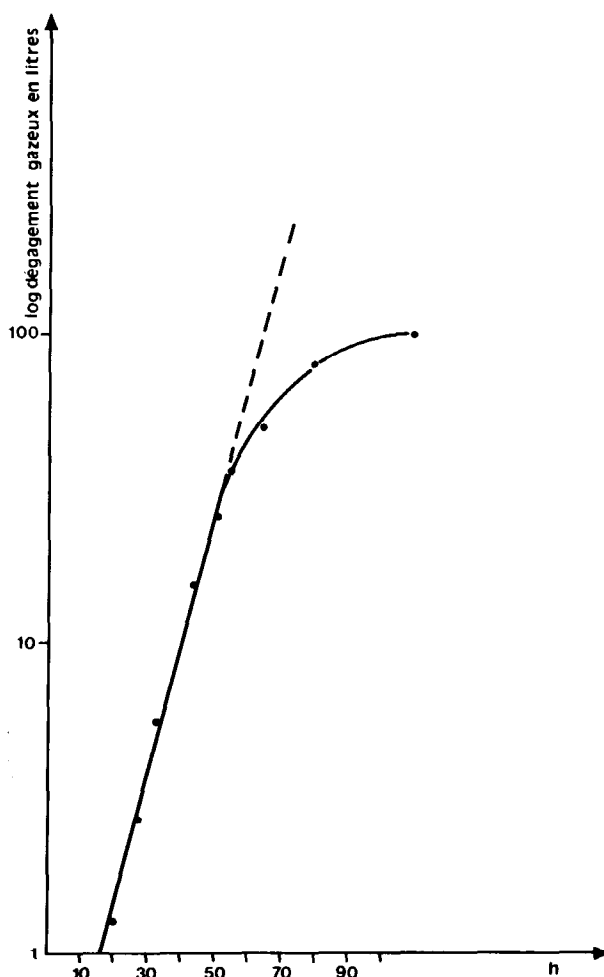


FIG. 2. - Evolution du dégagement gazeux en coordonnées semi logarithmiques.

2. ACTIVITÉ DES CELLULES ENTières

L'activité méthanigène a été mesurée sur de suspensions de cellules dans un tampon phosphate pH = 7 (0,2 M) contenant 100 mg de cellules poids humide, correspondant à 8,5 mg de protéines. Pour éliminer la formation de méthane endogène, les échantillons ont été pré-incubés 3 heures à 39° C sous atmosphère d'hydrogène. Après un nouveau gazage, le substrat et éventuellement l'inhibiteur ont été ajoutés.

La figure 3 montre qu'en atmosphère d'azote il n'y a aucune production de CH_4 . En atmosphère d'hydrogène les cellules possèdent une forte activité méthano-formatrice à partir de méthanol et à un niveau inférieur à partir de CO_2 . Par la suite nous avons toujours utilisé le méthanol comme substrat et l'hydrogène comme atmosphère gazeuse.

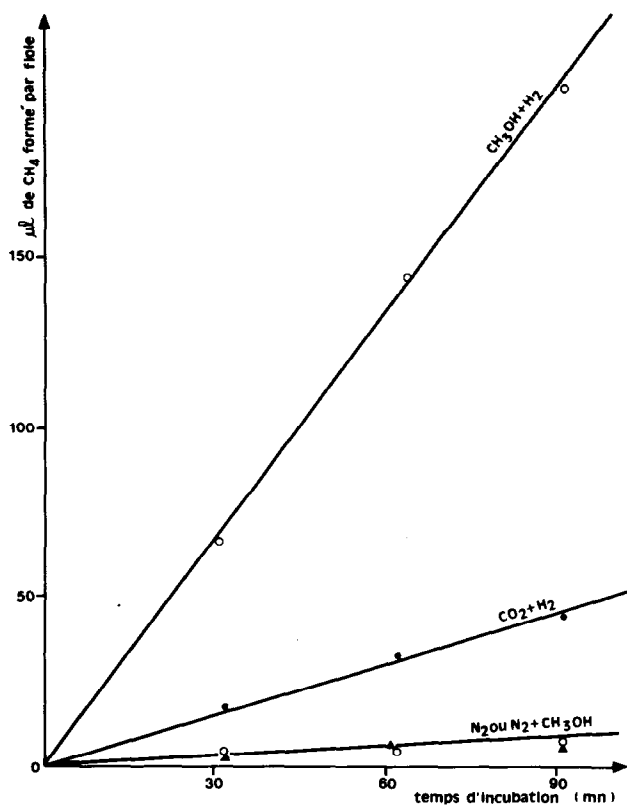


FIG. 3. - Formation de CH₄ par des cellules entières de *M. barkerii*.

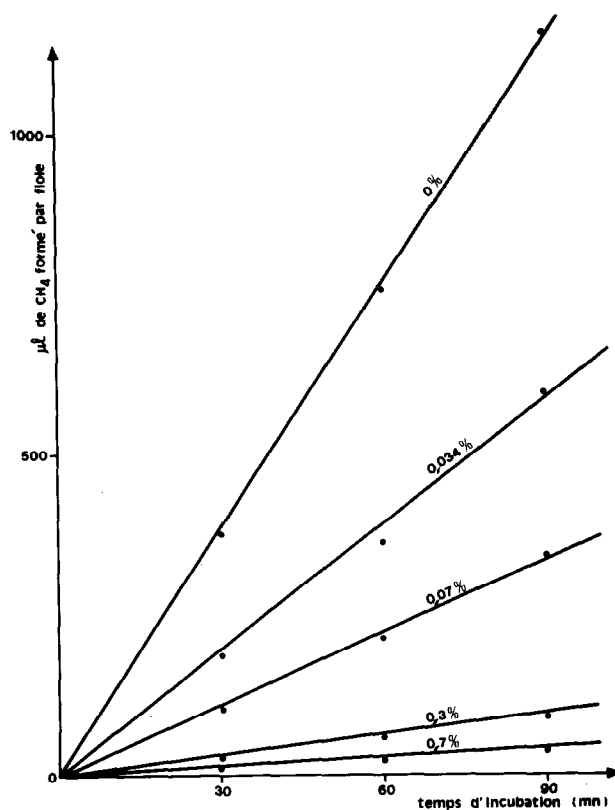


FIG. 4. - Influence de la concentration d'acétylène sur la formation de CH₄ par des cellules entières (atmosphère H₂, substrat : 40 µMoles/l = 5 µl de méthanol par fiole).

La figure 4 nous montre l'influence fortement inhibitrice de l'acétylène sur l'activité des cellules en présence de 5 µl de méthanol par échantillon soit une concentration de 40×10^{-6} M/l. L'addition de seulement 0,7 cm³ d'acétylène pour 100 cm³ de volume gazeux, correspondant à une concentration de 3×10^{-5} M dans la solution suffit à réduire de 98 % l'activité méthanigène des cellules.

Pour étudier le mécanisme de cette inhibition, nous avons mesuré les vitesses de formation de CH₄ en fonction de la concentration en méthanol, et pour différentes concentrations en acétylène (fig. 5). Ce graphique nous permet de calculer en l'absence d'acétylène, et lorsque la vitesse maximale de la réaction est atteinte, une activité spécifique des cellules de 1,9 µMole CH₄/heure/mg de protéines. Selon la théorie de MICHAELIS et MENTEN, la constante de dissociation du complexe enzymatique (K_m) est égale à la concentration en substrat lorsque la vitesse est la moitié de la vitesse maximale. Nous avons ainsi calculé un K_m apparent de 11 µMoles/litre, dans nos conditions expérimentales.

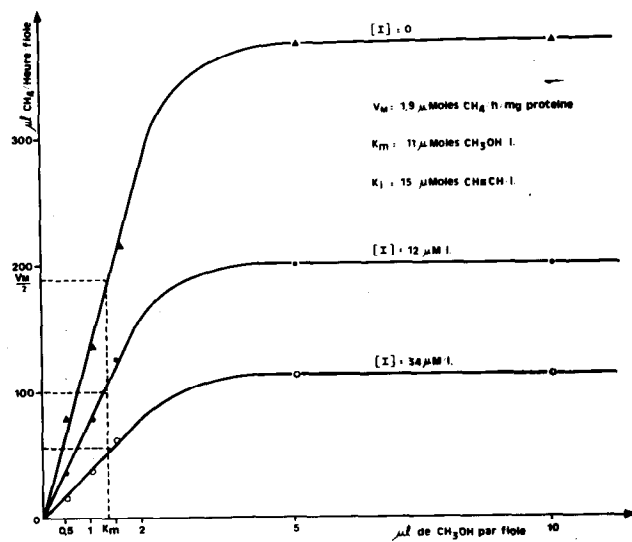


FIG. 5. - Vitesse de formation de CH₄ par des cellules entières en fonction de la concentration en substrat pour différentes concentrations d'acétylène.

D'autre part nous pouvons constater que le K_m ne varie pas sensiblement lorsque la concentration en acétylène augmente ce qui montre que cet inhibiteur ne modifie pas l'affinité du système enzymatique pour le méthanol. Par contre la vitesse maximale est fortement diminuée, l'acétylène inactivant une partie du système enzymatique. Il s'agit donc dans ce cas d'une inhibition non compétitive, et l'action inhibitrice de l'acétylène est indépendante de la concentration en méthanol.

D'après la théorie de MICHAELIS ET MENTEN dans le cas d'inhibition non compétitive, la vitesse maximale pouvant être atteinte est divisée par un facteur F_i qui peut donc être déterminé d'après le graphique, or

$$F_i = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

[I] étant la concentration de l'inhibiteur et K_i la constante d'inhibition.

Nous avons ainsi pu calculer un $K_i = 15 \mu\text{Moles}$ d'acétylène par litre de milieu. Pour les cellules entières l'affinité apparente du système enzymatique pour le méthanol est donc très voisine de son affinité pour l'acétylène.

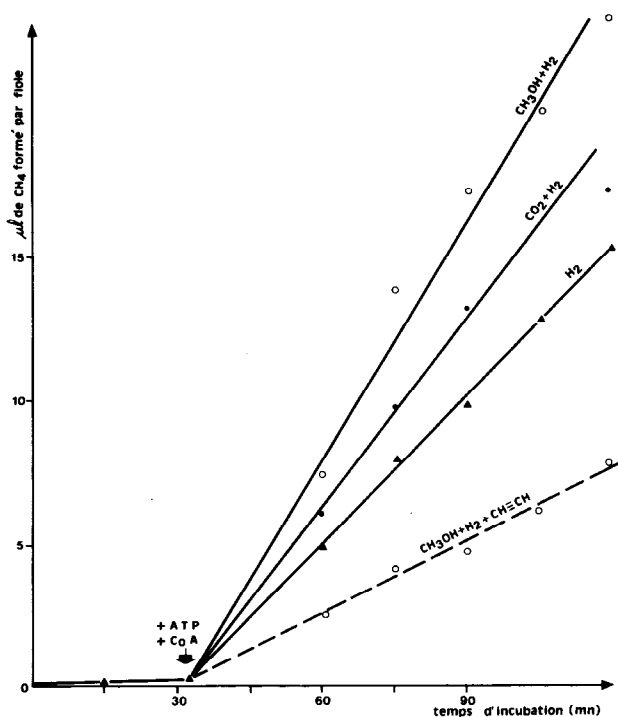


FIG. 6. - Formation de CH_4 par des extraits acellulaires. La production de CH_4 en présence de H_2 seul représente l'activité endogène.

3. ACTIVITÉ DES EXTRAITS ACELLULAIRES

Nous avons opéré comme pour les cellules entières, mais en ajoutant 1 ml d'extrait par flacon, ce qui représente 4 mg de protéines. La figure 6 nous confirme la nécessité d'ajouter de l'ATP et du Co-A pour que la réaction se produise, comme cela avait été noté par WOLIN *et col.*, 1963 a. Nous observons tout d'abord une importante production endogène de CH_4 . Pour éliminer cette activité endogène il aurait été nécessaire de préincuber les suspensions de cellules entières avant de confectionner les extraits. Pour la suite des expériences nous avons donc été amenés à soustraire la formation de CH_4 endogène pour chaque mesure que nous avons faite en présence de CH_3OH .

Comme pour les cellules entières nous constatons que les extraits peuvent produire du méthane à partir de méthanol ou de CO_2 , en présence d'hydrogène. Nous voyons d'autre part que l'acétylène inhibe la formation de CH_4 à partir de méthanol ou de CO_2 mais également à partir de l'endogène. Ceci semble indiquer que l'acétylène bloque le système enzymatique dans les tout derniers stades de la formation de CH_4 . Comme pour les cellules entières nous avons

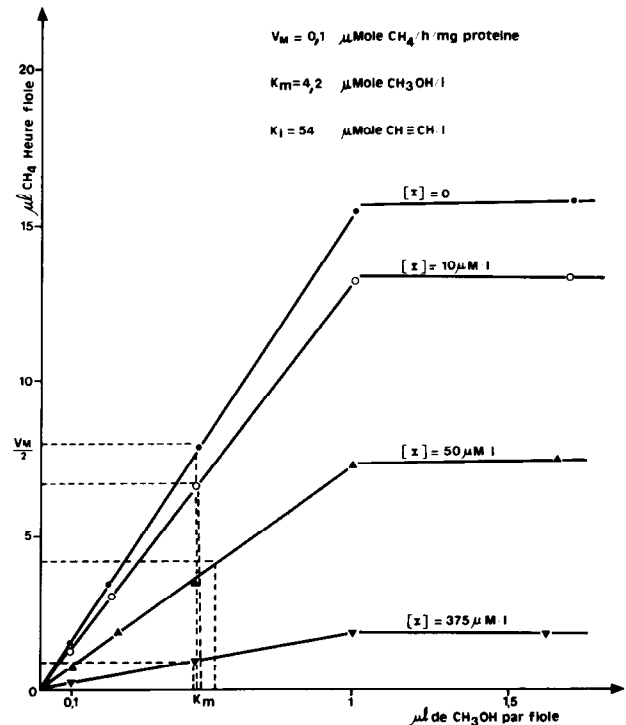


FIG. 7. - Vitesse de formation de CH_4 par des extraits bruts en fonction de la concentration en substrat et pour différentes concentrations d'acétylène.

mesuré la vitesse de formation de CH_4 en fonction de la concentration en méthanol pour différentes concentrations d'acétylène (fig. 7).

L'activité spécifique rapportée au mg de protéine a considérablement diminuée puisqu'elle est environ 30 fois plus faible dans les extraits ($0,1 \mu\text{Moles/h/mg}$ de protéine) que pour les cellules entières. Une grande partie de l'activité a donc été perdue lors de la préparation de ces extraits. Toutefois cette activité spécifique reste comparable à celles obtenues par WOLIN 1963 a et BLAYLOCK et STADTMAN, 1964 b qui ont rapporté des activités allant de $0,01$ à $0,03 \mu\text{Moles}$ de $\text{CH}_4/\text{h/mg}$ de protéines.

Comme pour les cellules entières nous pouvons conclure à une inhibition non compétitive puisque le K_m ne varie pas sensiblement alors que la vitesse maximale de formation de CH_4 est fortement diminuée par l'acétylène. Pour les extraits nous avons calculé un $K_m = 4,2 \mu\text{Moles/l}$ indiquant une affinité 3 fois plus importante du système enzymatique pour le méthanol, ce qui paraît normal étant donné que le substrat n'a pas à franchir la barrière de la paroi cellulaire.

Par contre la constante d'inhibition de l'acétylène ($58 \mu\text{Moles/l}$) est près de quatre fois plus élevée que pour les cellules entières, et indique une capacité inhibitrice trois fois moins élevée dans les extraits. La figure 8 confirme d'ailleurs ce résultat.

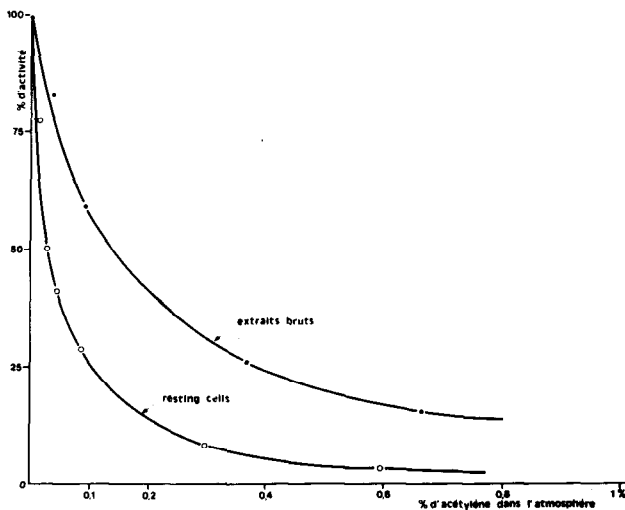


FIG. 8. - Influence de la concentration d'acétylène sur l'activité des cellules entières et des extraits bruts.

On peut l'expliquer en rappelant que le système enzymatique de formation de CH_4 a pour fonction de fournir l'énergie et l'ATP nécessaire au fonctionnement du métabolisme de la cellule, l'action inhibitrice de l'acétylène se répercutera donc fortement sur l'activité des cellules entières. Par contre, dans le cas des extraits acellulaires, l'ATP nécessaire aux réactions a été directement fourni ce qui a pour effet de découpler l'action inhibitrice de l'acétylène du système producteur d'énergie et de régénération de l'ATP.

CONCLUSION

La culture de *M. barkerii* sur méthanol nous a permis d'obtenir une quantité de cellules suffisante pour l'étude des activités méthanigènes des cellules entières et des extraits acellulaires. La vitesse de croissance de cette souche, de même que les rendements cellulaires et gazeux ont pu être déterminés et sont très satisfaisants.

La présence d'hydrogène est nécessaire à l'activité des cellules et des extraits qui requièrent en plus de l'ATP et du Co-A. Dans ces conditions le méthane peut être formé à partir du substrat endogène ou à partir de méthanol ou de CO_2 .

L'étude du mécanisme de l'inhibition par l'acétylène a montré qu'il s'agit d'une inhibition non compétitive aussi bien dans le cas des cellules que des extraits. On peut donc dire que l'acétylène inactive le système enzymatique indépendamment de la concentration en substrat. Son action est donc essentiellement différente de celle observée dans le cas de la nitrogénase qu'il inhibe compétitivement et par laquelle il est réduit en éthylène, ce qui n'est pas le cas ici.

L'action inhibitrice beaucoup plus marquée vis à vis des cellules entières que pour les extraits indique que le système de formation de CH_4 est fortement couplé énergétiquement au métabolisme de la cellule.

Enfin le fait que l'acétylène inhibe la formation de CH_4 à partir de tous les substrats testés et même la formation endogène semble indiquer que son action se situe dans les dernières étapes de la formation de CH_4 et vraisemblablement, au niveau de la cyanocobalamine-méthyl transférase étudiée chez *M. barkerii* par BLAYLOCK, 1968 et qui a montré que l'ATP est nécessaire à cette étape de la réaction.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM, le 6 mars 1980.

RÉFÉRENCES

- BLAYLOCK (B.A.) et STADTMAN (T.C.), 1963. - Biosynthesis of methane from the methyl moiety of methylcobalamin - *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 11 : 34-8.
- BLAYLOCK (B.A.) et STADTMAN (T.C.), 1964 a. - Biosynthesis of methane from the methyl moiety of methylcobalamin in extracts of *Methanosarcina barkerii*. From *Annals New-York Acad. Sci.* 112 : 799-803
- BLAYLOCK (B.A.) et STADTMAN (T.C.), 1964 b. - Enzymic formation of methylcobalamin in *Methanosarcina barkerii* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 17 : 475-480.
- BLAYLOCK (B.A.), 1968 Cobamide. - Dependant Methanol-cynocob (1) alamin methyltransferase of *Methanosarcina barkerii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 124 : 314-324.
- BROUZES (R.) et KNOWLES (R.), 1971. - Inhibition of growth of *Clostridium pasteurianum* by acetylene implication for nitrogen fixation assay. *Can. J. Microbiol.* 17 : 1483-9
- HARDY (R.W.F.), HOLSTEN (R.D.), JACKSON (E.K.) et BURNS (R.C.), 1968. - The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation = laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43 : 1185-1207.
- RAIMBAULT (M.), 1975. - Etude de l'influence inhibitrice de l'acétylène sur la formation biologique du méthane dans un sol de rizière. *Ann. Microbiol. (Inst. Past.)*, 126 A : 247-258.
- STADTMAN (T.C.) et BARKER (H.A.), 1951. - Studies on the methane fermentation. IX the origin of methane in the acetate and methanol fermentations by *Methanosarcina*. *J. Bacteriol.*, 61 : 81-86.
- STADTMAN (T.C.) et BLAYLOCK (B.A.), 1966. - Role of B₁₂ compounds in methane formation. *Fed. Proceed.*, 25 : 1657-61.
- TOERIEN (D.F.) et SIEBERT (M.L.), 1967. - A method for the enumeration and cultivation of anaerobic « acid forming » bacteria present in digesting sludge. *Water Research*, 1 : 397-404.
- WOLIN (E.A.), WOLIN (M.J.) et WOLFE (R.S.), 1963 a. - Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.*, 238 : 2882-2886.
- WOLIN (E.A.), WOLIN (M.J.) et WOLFE (R.S.), 1963 b, ATP. - Dependent formation of methane from methylcobalamin by extracts of *Methanobacterium omelianskii*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 12 : 464-8.
- WOLIN (E.A.), WOLFE (R.S.) et WOLIN (M.J.), 1964. - Viologen dye inhibition of methane formation by *Methanobacillus omelianskii*. *J. Bacteriol.*, 87 : 993-998.