

29

PHOTOPRODUCTION D'HYDROGÈNE PAR UNE SOUCHE DE BACTÉRIES PHOTOTROPHES SULFUREUSES MARINES

R. MATHERON et R. BAULAIGUE

Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme,
13397 MARSEILLE Cedex 13 (FRANCE)

RÉSUMÉ - La photoproduction d'hydrogène à partir de composés soufrés et organiques par une souche d'*Ectothiorhodospira* a été examinée. La souche bactérienne forme de l'hydrogène sur thiosulfate, sulfure et divers acides organiques. Les caractéristiques majeures de cette production sont définies sur sulfure. La production de H₂ est étroitement corrélée à l'assimilation du CO₂, et l'utilisation des substrats organiques endogènes et exogènes est exacerbée par le sulfure.

Mots clés : *Ectothiorhodospira*, photoproduction, hydrogène.

ABSTRACT - H₂ evolution from sulfur and organic compounds by *Ectothiorhodospira* strain BA1011 has been investigated. *Ectothiorhodospira* strain BA1011 produces hydrogen from sulfide, thiosulfate and some organic acids as propionate, acetate, lactate and succinate. Major characteristics are defined from sulfide: experiments show a correlation between photohydrogen production and CO₂ assimilation as well as an increase of the utilization of endogeneous and exogeneous organic substrates with sulfide as electron donor.

Key words : *Ectothiorhodospira*, photoproduction, hydrogen.

INTRODUCTION

La photoproduction d'hydrogène est une propriété largement répandue chez les bactéries phototrophes, en particulier parmi les espèces appartenant à la famille des Rhodospirillaceae. Quelques travaux ont porté sur la production de H₂ par les Chromatiaceae en présence de donneurs d'électrons organiques ou minéraux soufrés tel que le thiosulfate (Bregoff et Kamen, 1952; Newton et Wilson, 1953; Arnon et col., 1961; Ormerod et col., 1961). Plus récemment, une libération de H₂ avec le sulfure comme source d'électrons a été signalée chez ces microorganismes (Ohta et Mitsui, 1981; Matheron et Baulaigue, 1983).

Dans ce travail, nous avons examiné la production de H₂ nitrogénase-dépendante à partir de composés organiques et minéraux par une souche de bactéries phototrophes sulfureuses marines, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ectothiorhodospira shaposhnikovii souche BA1011 et toutes les méthodes expérimentales ont été décrites précédemment (Matheron et Baulaigue, 1972 et 1983).

Les bactéries, cultivées sur le milieu de Pfennig (1965) contenant 3 % de NaCl et 0,3 % de MgCl₂.6H₂O, sont incubées à la lumière de lampes incandescentes (10.000 lux). La nitrogénase est induite sous atmosphère d'azote dans un milieu de culture dépourvu

d'azote combiné.

Les productions d'hydrogène ont été évaluées avec des cellules non proliférantes incubées dans un respiromètre de Warburg, sous atmosphère d'argon et soumises à une intensité lumineuse de 10.000 lux. Chaque fiole contient 7,5 mg de protéines cellulaires. Le compartiment central renferme une solution de KOH ou du tampon CO_2 . Les substrats, sulfure (solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ à 2,4 %), thiosulfate (solution à 100 mM) et acides organiques sous forme de sels sodiques (solutions à 250 mM) sont introduits dans le diverticule latéral. La teneur en sulfure de la solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ est déterminée par colorimétrie.

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et col. (1951).

RÉSULTATS

Le dégagement d'hydrogène par *E.BA1011* est sous la dépendance de la lumière, du sulfure et du CO_2 (fig.1). Le CO_2 exacerbe la production de gaz à la lumière en présence de sulfure (courbe 2). Le dosage du sulfure contenu dans les fioles en fin d'expérience révèle qu'aucune consommation de donneurs d'électrons ne se manifeste en l'absence de CO_2 . Dans ces conditions, l'hydrogène formé doit être considéré comme une production sur les substrats endogènes des cellules. En outre, la mobilisation des réducteurs endogènes n'a lieu qu'avec le sulfure (courbe 3).

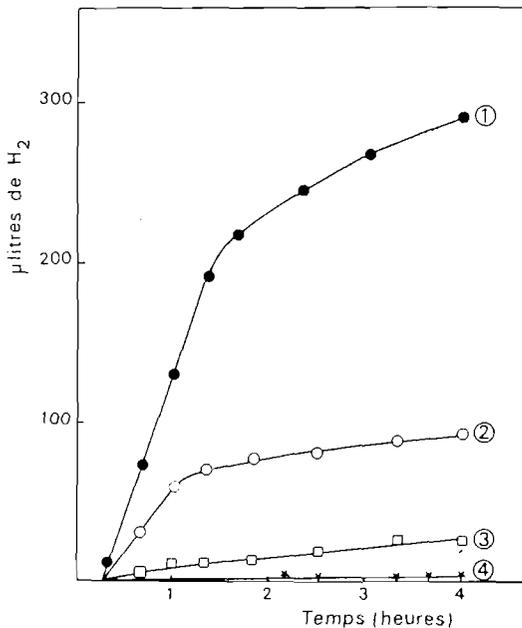


Figure 1 : Influence de la lumière, du CO_2 et du sulfure sur la production de H_2 par *Ectohiorhodospira BA 1011*. Caractéristiques particulières de chaque système.

1. Lumière, tampon CO_2 , 0,2 ml de solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ à 2,4 %
 2. Lumière, KOH, 0,2 ml de solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
 3. Lumière, tampon CO_2
 4. Obscurité, tampon CO_2 , 0,2 ml de solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- (d'après Matheron et Baulaigue, 1983).

Le sulfure, avec une activité spécifique de $15,2 \mu$ litres de H_2 et un rendement de $0,71 \mu$ mole de H_2 , est une source privilégiée d'électrons pour *E.BA1011* (tab. 1). Les activités spécifiques et les rendements sur acides organiques restent plus faibles. L'addition simultanée de sulfure accroît la production d'hydrogène à partir du propionate et de l'acétate ; les rendements passent pour le propionate de $0,05$ à $0,23 \mu$ mole de H_2 mais seulement de $0,16$ à $0,19 \mu$ mole de H_2 pour l'acétate, après déduction de l'hydrogène formé à partir du sulfure.

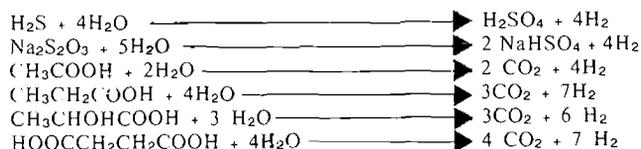
Substrat	Activité	Rendement	Rendement théorique
Sulfure	15,2	0,71	4
Thiosulfate	6,3	0,45	4
Acétate	7,3	0,16	4
Propionate	1,7	0,05	7
Lactate	4,6	0,10	6
Succinate	10,4	0,23	7

Tableau I. Photoproduction de H₂ par *Ectothiorhodospira* BA1011 sur différents substrats.

Activité en μ litres de H₂/heure/mg de protéines.

Rendement en μ moles de H₂/ μ moles de substrat

Les rendements théoriques ont été établis à partir des équations suivantes :



DISCUSSION

Les résultats démontrent que *E. BA1011*, bactérie phototrophe sulfureuse, libère de l'hydrogène sur un milieu entièrement minéral à partir de composés minéraux soufrés, en particulier sur sulfure. Cette production dépasse celle obtenue à partir des donneurs organiques d'électrons. Comme pour la souche marine de *Chromatium* isolée par Ohta et Mitsui (1981), *E. BA1011* accroît la formation d'hydrogène en mixotrophie.

Les caractéristiques majeures de la production de H₂ par *E. BA1011*, étudiées sur sulfure, sont très similaires à celles observées par divers auteurs avec les autres souches de bactéries phototrophes rouges sulfureuses ou non sulfureuses (Gest et Kamen, 1949 ; Arnon et col., 1952 ; Meyer et col., 1978 ; Kim et col., 1980). Toutefois, les activités sur les donneurs organiques d'électrons endogènes et exogènes (propionate et acétate) ne s'exercent pleinement qu'avec le sulfure, et l'utilisation de ce dernier est strictement CO₂-dépendant. La photoproduction d'hydrogène semble corrélée à l'assimilation du CO₂, indiquant la participation du sulfure à un processus de transfert d'électrons d'une signification plus générale. Par ailleurs, le sulfure doit permettre la mobilisation des composés organiques en modifiant certaines conditions du milieu.

Les activités photoproductrices faibles de la souche étudiée, comparées aux valeurs rapportées dans la littérature, ne sont pas surprenantes. En effet, l'activité nitrogénasique de *E. BA1011* (Matheron et Baulaiguc, 1983) est dix fois inférieure à celle observée par Bogner *et al.*, (1982) pour *E. goldameirae* et très éloignée des taux mesurés habituellement avec des Rhodospirillaceae (Madigan et al., 1984). L'activité varie largement en fonction de l'état des cellules ; comme l'ont montré Ohta et Mitsui (1981), la production de H₂ par des cellules de *Chromatium* récoltées en fin de phase logarithmique de croissance ou en début de phase stationnaire atteint des valeurs de l'ordre de 1μ mole de H₂/heure/mg de protéines, proche de l'activité notée dans notre travail ($0,68 \mu$ mole de H₂/heure/mg de protéines).

Par ailleurs, l'azote moléculaire ne constitue pas un inducteur de choix de la nitrogénase contrairement au glutamate ou à des concentrations limitantes d'ion ammonium (Sweet et Burris, 1981 ; Arp et Zumft, 1983).

- ARNON D.I., LOSADA M., NOZAKI M., TAGAWA K., 1961. Photoproduction of hydrogen. photofixation of nitrogen and a unified concept of photosynthesis. *Nature* 190 : 601-606.
- ARP D.J., ZUMPEL W.G., 1983. Overproduction of nitrogenase by nitrogen-limited cultures of *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol* 153 : 1322-1330.
- BOGNAR A., DESROSIERS L., LIBMAN M., NEWMAN E.B., 1982. Control of nitrogenase in a photosynthetic autotrophic bacterium, *Ectothiorhodospira* sp. *J. Bacteriol* 152 : 706-713.
- BREGOFF H.M., KAMEN M.D., 1952. Photohydrogen production in *Chromatium*. *J. Bacteriol* 63 : 147-149.
- GEST H., KAMEN M.D. 1949. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science* 109 : 558-559
- KIM J.S., ITO K. TAKAHASHI H., 1980. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric. Biol. Chem.* 44 : 827-833.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- MADIGAN M., COX S.S., STEIGMAN R.A., 1984. Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. *J. Bacteriol* 157 : 73-78.
- MATHERON R., BAULAIGUE R., 1972. Bactéries photosynthétiques sulfureuses marines. Assimilation des substances organiques et minérales, et influence de la teneur en chlorure de sodium du milieu de culture sur leur développement. *Arch. Microbiol* 86 : 291-304.
- MATHERON R., BAULAIGUE R., 1983. Photoproduction d'hydrogène sur soufre et sulfure par des Chromatiaceae. *Arch. Microbiol* 135 : 211-214.
- MEYER J., KELLEY B.C., VIGNAIS P.M., 1978. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Biochim* 60 : 254-260.
- NEWTON J.W., WILSON P.W., 1953. Nitrogen fixation and photoproduction of molecular hydrogen by Thiorhodaceae. *Antonie van Leeuwenhoek J microbiol Serol* 19 : 71-77
- ORMFROD J.G., ORMEROD K.S., GEST H., 1961. Light-dependant utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria : relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys* 94 : 449-463.
- OHTA Y., MIYASHI A., 1981. Enhancement of hydrogen photoproduction by marine *Chromatium* sp Miami PBS 1071 grown in molecular nitrogen. In : *Advances in Biotechnology, vol I M Mao-Young and CW Robinson* (Ed). Pergamon Press : Toronto.
- PFENNIG N., 1965. Anreicherungskultur für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zbl Bakt Labt Orig, Suppl* 1 : 179-189.
- SWEET W.J., BURRIS R.H., 1981. Inhibition of nitrogenase activity by NH_4^+ in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* 145 : 824-831.