

SUR LE MÉTABOLISME AÉROBIE ET ANAÉROBIE DE *E. COLI*

par

JEKISIEL SZULMAJSTER, MARIANNE GRUNBERG-MANAGO ET  
ANNIE PROUVOST*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

Dans une série de mémoires consacrés à la fermentation et à la respiration de *E. coli*, AUBEL ET SZULMAJSTER<sup>1,2</sup> étaient arrivés à la conclusion que *E. coli*, anaérobie facultatif, ne possède pas, en présence d'oxygène, un système respiratoire du type WARBURG-KEILIN. Il se comporte plutôt comme un anaérobie strict qui, grâce à un mécanisme à élucider, fixe l'hydrogène provenant du processus fermentaire sur l'oxygène, agissant comme accepteur au même titre que le bleu de méthylène. C'est un exemple d'un microorganisme aérobie facultatif ayant à l'air un système de catabolisme glucidique du type fermentaire.

Récemment FOWLER<sup>3</sup> a montré que, dans une culture de *E. coli* en voie de croissance exponentielle, le remplacement de l'air par un mélange  $N_2 + CO_2$  entraîne un arrêt immédiat de la croissance. Après un temps de latence de 30-50 minutes, la croissance reprend et atteint à peu près la même vitesse qu'en aérobie. Durant la phase de latence il n'y a pas de consommation mesurable de glucose. L'auteur arrive à la conclusion que l'utilisation anaérobie du glucose par *E. coli* dépend d'un système enzymatique adaptatif. FOWLER n'a pas identifié ce système.

Nous avons repris la question et démontré que le système enzymatique en cause est l'hydrogène lyase, inactivée par l'aération au cours de la croissance.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Techniques*

Les expériences ont été faites avec la souche (MONOD) de *E. coli* provenant de l'Institut Pasteur, cultivée sur le milieu synthétique suivant:  $PO_4KH_2$  27.2 g;  $SO_4(NH_4)_2$  4.0 g;  $SO_4Mg$ , 7  $H_2O$  0.4 g;  $Cl_2Ca$  0.01 g;  $SO_4Fe$ , 7  $H_2O$  0.005 g; glucose 10.0 ou 2.0 g; amené à pH 7.4 avec NaOH 10 N; eau pour 1000 ml. En outre, dans certaines expériences on a ajouté 10 ml d'extrait de levure à 10%, par litre de milieu. Le glucose et l'extrait de levure sont stérilisés à part et ajoutés aseptiquement au milieu.

Les bactéries sont toujours cultivées à l'air, soit avec agitation (*aération forcée* =  $S_{af}$ ), soit sans agitation (100 ml de milieu dans des erlenmeyers de 300 ml-*anaérobiose partielle* =  $S_{ap}$ ). Les bactéries, après 16 heures de culture, sont lavées deux fois avec du chlorure de sodium à 0.9% puis suspendues dans du tampon phosphate  $M/15$  à pH 7. Les expériences de croissance sont faites à 37° dans un récipient précédemment décrit<sup>4</sup>. L'aérobie est assurée par barbotage d'air préalablement stérilisé; l'anaérobiose, par barbotage d'azote, débarrassé des traces d'oxygène par passage dans un four à 500°, contenant de la tournure de cuivre.

Les prélèvements sont faits à intervalles de temps donnés pour mesurer la croissance des bactéries et le glucose disparu. Les mesures de densité bactérienne sont faites par opacimétrie à l'électrophotomètre de MEUNIER, avec écran bleu et exprimées en poids sec d'après une courbe standard. On sait que pour *E. coli*<sup>5</sup>, le rapport entre le poids sec et la densité optique ne varie pas sensiblement au cours de la croissance. La densité bactérienne est exprimée en divisions du tambour

de l'électrophotomètre et convertie en logarithme de base deux, convention qui, d'après MONOD<sup>5</sup>, facilite l'évaluation du taux de croissance.

L'activité deshydrogénasique est mesurée par la technique de THUNBERG et exprimée en  $Q_{BM}$  = ml d'hydrogène transféré au bleu de méthylène par mg de poids sec de bactéries et par heure. L'activité hydrogénélyasique est mesurée dans l'appareil de WARBURG en atmosphère d'azote et exprimée en  $Q_{H_2}$ . Les deshydrogénases et l'hydrogénélyase sont plus actives lorsque les bactéries sont cultivées sur milieu peptone-glucosé que sur le milieu synthétique. Aussi avons-nous employé le milieu peptoné pour cette étude. Il était inutile d'ajouter du formiate au milieu de culture, la dégradation du glucose par *E. coli* produisant le formiate nécessaire à la formation de l'hydrogénélyase, enzyme adaptatif.

La respiration et la fermentation sont mesurées par la technique de WARBURG. Pour doser les produits formés au cours de la dégradation du substrat chaque essai est fait en triple. On réunit à la fin de l'expérience le contenu des trois cupules, on déprotéinise par l'acide perchlorique à 5% (concentration finale) et on effectue les dosages sur les liquides surnageants. Tous les dosages initiaux sont faits dans les mêmes conditions. Les chiffres donnés dans les tableaux sont obtenus en défalquant ceux des dosages initiaux.

Tous les dosages sont faits par les méthodes indiquées précédemment<sup>6</sup> à l'exception de l'acide lactique dosé par la méthode de BARKER ET SUMMERSON<sup>7</sup>, de l'acide pyruvique par la méthode de LU<sup>7</sup> et de l'alcool par la méthode de NICLOUX, LE BRETON ET DONTCHEFF<sup>8</sup>.

### RÉSULTATS

Dans un travail antérieur<sup>6</sup> nous avons constaté que les bactéries développées à l'air sans agitation ( $S_{ap}$ ) sont capables de fermenter le glucose avec un dégagement d'anhydride carbonique et d'hydrogène. Si le système fermentaire de *E. coli* est adaptatif, les bactéries cultivées dans des conditions d'aération forcée ( $S_{af}$ ) doivent perdre leur pouvoir de fermenter d'emblée le glucose. Nous avons donc étudié comparativement la dégradation du glucose en anaérobiose, avec les suspensions  $S_{af}$  et  $S_{ap}$ .

Alors que le dégagement d'anhydride carbonique et d'hydrogène est immédiat pour les suspensions  $S_{ap}$  à partir du glucose en anaérobiose (Fig. 1, courbe 1), les bactéries  $S_{af}$  ne dégagent ni anhydride carbonique ni hydrogène (Fig. 1, courbe 2). Cependant, après une phase de latence d'une heure environ, le dégagement d'hydrogène et de gaz carbonique peut reprendre (Fig. 1, courbe 2 et Tableau I). Les résultats sont les mêmes quel que soit le moyen utilisé pour assurer l'anaérobiose (atmosphère d'azote ou atmosphère d'azote-gaz carbonique). Nous retrouvons ainsi les résultats de FOWLER; la différence de technique, bactéries en croissance ou bactéries en suspension dans le tampon, ne paraît pas, pour l'essentiel, les modifier. Le temps d'adaptation est simplement plus long avec les bactéries non proliférantes. La quantité de glucose disparu dans la première heure, en anaérobiose, est toujours la même, quelle que soit la suspension bactérienne:  $S_{af}$  ou  $S_{ap}$ , bien que dans le premier cas il n'y ait pas de dégagement gazeux.

On voit, d'après le Tableau II, qu'il se produit une accumulation anaérobie d'acide formique avec les suspensions  $S_{af}$  et pas de dégagement d'anhydride carbonique. Au contraire, avec les suspensions  $S_{ap}$  on ne trouve qu'une quantité négligeable d'acide formique, mais il se produit un dégagement d'anhydride carbonique. La quantité d'acide formique accumulée dans le premier cas correspond à l'anhydride carbonique dégagé dans l'autre. Il n'y a pas d'autre différence dans la nature des produits formés au cours de la fermentation du glucose. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque l'on emploie le pyruvate comme substrat (Tableau III et Fig. 1, courbes 3 et 4). Ici aussi, la quantité d'anhydride carbonique dégagée dans un cas correspond à l'augmentation d'acide formique formé dans l'autre. Par contre, lorsque ces mêmes expériences sont faites en aérobiose, avec les deux sortes de suspensions  $S_{af}$  et  $S_{ap}$ , il n'y a jamais d'ac-

cumulation d'acide formique. La quantité d'anhydride carbonique dégagée par les bactéries  $S_{af}$  (et le QR) sont toujours égaux, sinon supérieurs à ceux observés avec les bactéries  $S_{ap}$  (Tableau IV). Les suspensions  $S_{af}$  peuvent donc dégrader le formiate en aérobiose, mais sont incapables de le décomposer en anaérobiose. Il est clair que l'enzyme responsable de la dégradation du formiate en anaérobiose n'apparaît pas lorsqu'il y a aération forcée durant la croissance des bactéries. Or, on sait précisément depuis Yudkin<sup>9</sup>, que l'hydrogèneylase de *E. coli*\* est absente dans ces conditions. Effectivement, les résultats du Tableau V montrent que, chez les bactéries  $S_{af}$  l'hydrogèneylase est absente, alors que la formico-deshydrogènease reste toujours très active. Il faut donc

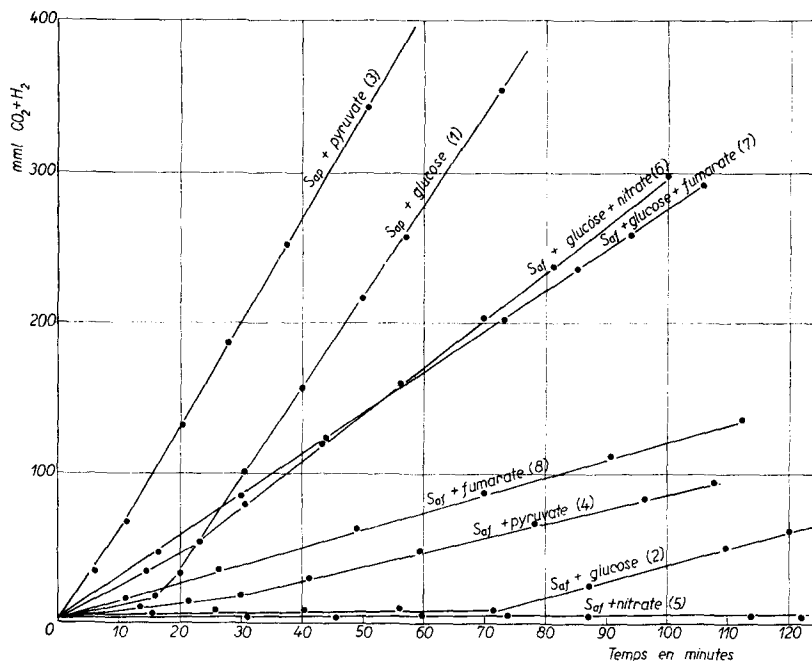


Fig. 1. Dégagement de  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  en anaérobiose par les suspensions  $S_{ap}$  et  $S_{af}$  de *E. coli*. Expérience faite dans l'appareil de Warburg. Chaque cupule contient: 1 ml de suspension bactérienne (= 3 mg de poids sec), 0.5 ml de substrat (glucose  $M/90$  et pyruvate  $M/60$ , concentrations finales), 0.2 ml d'accepteur d'hydrogène (fumarate et nitrate  $M/100$ , conc. finales); complété à 2 ml, 5 avec du tampon phosphate  $M/15$  à pH 6.8. Le substrat est ajouté après 10 minutes d'équilibre à 37°.

admettre que l'enzyme responsable de la dégradation du formiate en anaérobiose est l'hydrogèneylase, tandis qu'à l'air, le formiate est dégradé par la formico-deshydrogènease. Ceci explique l'accumulation du formiate en anaérobiose (Tableau II) et non en aérobiose (Tableau IV).

Le Tableau I fait ressortir aussi que les autres produits formés au cours de la dégradation du glucose sont les mêmes, que *E. coli* soit cultivé avec ou sans agitation. D'autre part, ni l'activité deshydrogénasique, ni le processus respiratoire en général, ne sont modifiés par l'aérobiose forcée. Même dans ce dernier cas, la respiration ne semble pas se faire par la voie des acides di- et tricarboxyliques. Le Tableau VI montre

\* Nous avons d'autre part démontré<sup>10</sup> que l'hydrogèneylase est un enzyme bien distinct de la formico-deshydrogènease et de l'hydrogènease.

TABLEAU I

DÉGAGEMENT D' $H_2$  ET DE  $CO_2$  PAR LA SUSPENSION  $S_{af}$  EN PRÉSENCE DE GLUCOSE

Chaque cupule de l'appareil de Warburg contient: 1 ml de suspension  $S_{af}$  (= 3 mg de poids sec) 0.5 ml de glucose ( $M/90$ , conc. finale), 0.2 ml de nitrate ( $M/100$ , conc. finale); complété à 2.5 ml avec du tampon phosphate  $M/15$  à pH 6.8. Le substrat est ajouté après 10 minutes d'équilibre à 37°. La quantité d' $H_2$  dégagé est calculée d'après la "méthode directe". Atmosphère: azote purifié.

Temps en minutes	ml d' $H_2$ dégagé		ml de $CO_2$ dégagé	
	avec nitrate	sans nitrate	avec nitrate	sans nitrate
10	0	0	26	0
20	0	0	46	0
30	0	0	80	0
40	0	19.5	108	10
50	0	41	140	45
60	0	67	172	89
70	0	96	202	135

TABLEAU II

DÉGRADATION ANAÉROBIE DU GLUCOSE PAR *E. coli* CULTIVÉ À L'AIR AVEC OU SANS AGITATION

Chaque cupule de l'appareil de Warburg contient: 1 ml de suspension bactérienne = 6 mg de poids sec; 0.5 ml de glucose conc. finale  $M/90$ ; complété à 3 ml avec tampon phosphate  $M/15$  à pH 6.8. Le substrat est ajouté après 10 minutes d'équilibre à 37°. Les dosages ont été effectués sur le contenu des trois cupules. Les chiffres sont calculés en mg de carbone. Durée de l'expérience: 60 minutes.

	Bactéries cultivées sans agitation ( <i>Sap</i> )	Bactéries cultivées avec agitation ( <i>Saf</i> )
Glucose disparu	8.8	8.65
Produits formés en % du glucose disparu		
Acide pyruvique	1.2	1.9
Acide lactique	11.3	5.2
Acide acétique	32.3	38.3
Alcool éthylique	19.7	20.0
Acide formique	0.9	11.0
$CO_2$	9.8	0
% de C retrouvé	75.2	76.4

TABLEAU III

DÉGRADATION ANAÉROBIE DU PYRUVATE PAR *E. coli* CULTIVÉ À L'AIR AVEC OU SANS AGITATION

Mêmes conditions que dans le Tableau I, mais le glucose est remplacé par le pyruvate conc. finale  $M/40$ ; 1 ml de suspension bactérienne = 7 mg de poids sec. Les chiffres sont calculés en mg de carbone.

	Bactéries cultivées sans agitation ( <i>Sap</i> )	Bactéries cultivées avec agitation ( <i>Saf</i> )
Pyruvate disparu	13.5	13.5
Produits formés:		
Acide formique	10.8	14.1
$CO_2$	3.2	1.4

TABLEAU IV

DÉGRADATION AÉROBIE DU GLUCOSE PAR *E. coli* CULTIVÉ À L'AIR AVEC OU SANS AGITATION

Mêmes conditions que dans le Tableau I mais 1 ml de suspension bactérienne = 7 mg de poids sec. Les chiffres sont calculés en mg de carbone.

	Bactéries cultivées sans agitation (Sap)	Bactéries cultivées avec agitation (Saf)
Glucose disparu	7.4	5.4
Produits dosés:		
Acide formique	0	0
CO <sub>2</sub>	17	22.4
QR	0.65	0.84

TABLEAU V

INFLUENCE DE L'AGITATION AU COURS DE LA CROISSANCE AÉROBIE DE *E. coli*  
SUR L'ACTIVITÉ DESHYDROGÉNASIQUE

Chaque tube de THUNBERG contient: 0.5 ml de suspension bactérienne = 1 mg de poids sec; 1 ml de substrat; 0.5 ml de bleu de méthylène à conc. finale  $M/10,000$ ; complété à 2.5 ml avec du tampon phosphate  $M/15$  à pH 6.8. Le bleu de méthylène et le substrat sont ajoutés après 10 minutes d'équilibre à 37°. L'activité deshydrogénasique est exprimée en  $Q_{BM}$  et l'activité hydrogénélyasique en  $Q_{H_2}$ . Cette dernière étant mesurée dans l'appareil de Warburg, sans bleu de méthylène.

	Bactéries cultivées sans agitation (Sap)	Bactéries cultivées avec agitation (Saf)
Bactéries seules	< 1.8	< 1.8
Bactéries + glucose $M/90$	28	24.5
Bactéries + pyruvate $M/40$	11	15.3
Bactéries + formiate $M/60$	48	58
Bactéries + H <sub>2</sub>	56	56
Hydrogénélyase:		
Bactéries + formiate	115	< 1.8

TABLEAU VI

ACTION DU MALONATE ET DE L'AZOTURE DE SODIUM SUR LA RESPIRATION DE *E. coli*  
CULTIVÉ À L'AIR AVEC AGITATION ( $S_{af}$ )

Chaque cupule de Warburg contient: 1 ml de suspension bactérienne = 3 mg de poids sec; 0.5 ml de glucose à conc. finale  $M/90$ ; 0.2 ml de malonate de sodium à conc. finale  $M/5$  ou 0.2 ml d'azoture de sodium à conc. finale  $M/350$  ou 0.2 ml d'eau, complété à 2.5 ml avec du tampon phosphate  $M/15$  à pH 6.8. 0.2 ml de NaOH à 20% pour absorber le CO<sub>2</sub>. Les chiffres sont exprimés en ml d'O<sub>2</sub> consommé. Le substrat est ajouté après 10 minutes d'équilibre à 37°. La respiration endogène est défalquée de ces chiffres.

Temps en minutes	10	20	30	40	80
Glucose	54	73	116	141	218
Glucose + malonate	47	67	105	134	212
Glucose + azoture	80	124	211	163	355

que ni le malonate, ni l'azoture de sodium n'inhibent la respiration de *E. coli* en présence de glucose. Nous avons en outre constaté que le citrate n'est pas métabolisé. Ces résultats sont identiques à ceux trouvés précédemment<sup>11, 12, 13</sup> avec les suspensions  $S_{ap}$  de *E. coli*.

Au cours de la croissance de *E. coli*, l'aération ne paraît donc pas entraîner sur le système enzymatique intervenant dans la dégradation anaérobie du glucose, d'autre répercussion que l'absence de l'hydrogène lyase. Il faut admettre que la formico-deshydrogénase ne peut dégrader le formiate en anaérobiose chez *E. coli*. Ceci nous a conduits à penser que l'accepteur d'hydrogène nécessaire pour le fonctionnement de cet

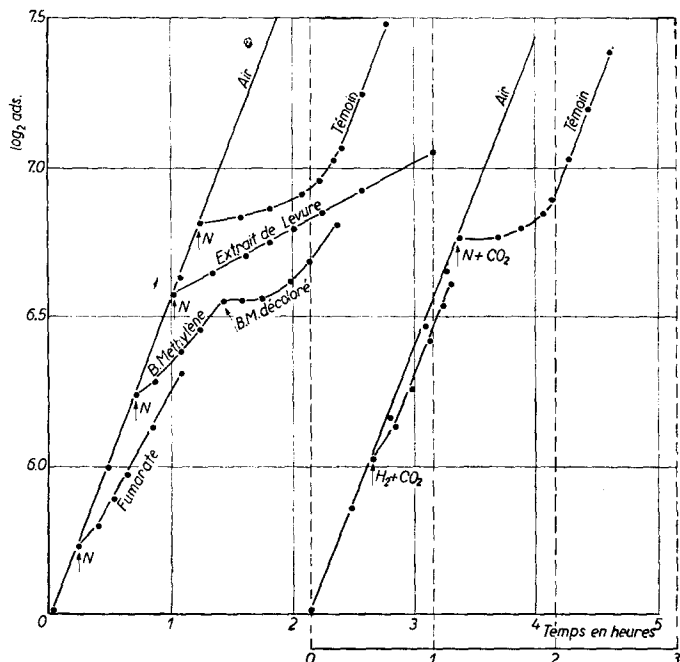


Fig. 2. Courbes de croissance de *E. coli* transféré de l'aérobiose en anaérobiose. L'anaérobiose est assuré par passage d'azote pur, d'un mélange  $N_2/CO_2$  ou  $H_2/CO_2$ . Le bleu de méthylène ( $M/50,000$ , conc. finale) est ajouté au début de l'expérience. Pour faire les mesures d'opacité, on oxyde préalablement le colorant par passage d'air dans les prises. L'extrait de levure (concentration indiquée dans les techniques) est également ajouté au début de l'expérience. Le fumarate ( $M/100$ , conc. finale) est ajouté 10 minutes avant passage de l'azote. L'opacité de la culture, au moment de son transfert en anaérobiose, est la même dans tous les cas ( $\log_2 \text{ ads.} = 6.8$ ). Les courbes sont décalées pour la clarté de la figure.  $T^\circ = 37^\circ$ .

enzyme manque en anaérobiose. En présence d'un accepteur d'hydrogène une suspension  $S_{af}$  devrait dégrader le formiate en anaérobiose et l'on observerait, en présence de glucose, un dégagement de gaz carbonique et non d'hydrogène. C'est effectivement ce que l'on observe en présence d'un extrait de levure, ou mieux encore, de fumarate ou de nitrate (Fig. 1, courbes 5, 6, 7, 8).

Ces derniers résultats, obtenus avec des suspensions de bactéries non proliférantes, se vérifient également avec des bactéries en croissance. L'addition d'un accepteur d'hydrogène (extrait de levure, fumarate ou bleu de méthylène) permet la dégradation du formiate en anaérobiose et supprime complètement l'arrêt de croissance observé par

FOWLER. De plus, au moment où le bleu de méthylène est décoloré et ne peut plus servir d'accepteur d'hydrogène il se produit un arrêt de croissance. La croissance ne reprend qu'au bout d'un temps de latence et on retrouve alors le phénomène de FOWLER.

L'arrêt de croissance peut également être annulé sans addition d'un accepteur d'hydrogène, mais en remplaçant le mélange 95%  $N_2$  + 5%  $CO_2$  par le mélange 90%  $H_2$  + 10%  $CO_2$  (Fig. 2). La croissance est alors semblable à celle observée en aérobiose.

#### DISCUSSION

De l'ensemble des résultats exposés ressortent les faits essentiels suivants: les suspensions  $S_{af}$  fermentent bien le glucose, mais il ne se produit pas de dégagement d'anhydride carbonique ni d'hydrogène. Par contre, il y a accumulation d'acide formique lequel est la seule source d'anhydride carbonique et d'hydrogène chez *E. coli*. L'acide formique ne peut être dégradé en anaérobiose par la suspension  $S_{af}$  en raison de l'absence de l'hydrogénelyase. Cet enzyme peut cependant être synthétisé après une période de latence, car le dégagement de gaz carbonique et d'hydrogène peut reprendre après une heure environ.

La formico-deshydrogénase ne fonctionne pas en anaérobiose chez *E. coli* par absence d'accepteur d'hydrogène. L'acide pyruvique ne peut dans ces conditions, jouer ce rôle. Nous l'avons vérifié en constatant que l'acide formique n'est pas dégradé en anaérobiose par la suspension  $S_{af}$  en présence d'acide pyruvique. Lorsqu'on fournit un autre accepteur, l'acide formique est dégradé. Il ne s'agit pas d'une resynthèse plus rapide de l'hydrogénelyase, comme on pouvait le supposer, car il se produit uniquement un dégagement de gaz carbonique et non d'hydrogène (Tableau I). De plus la vitesse de ce dégagement est constante au cours de l'expérience (Fig. 1, courbes 6, 7).

L'accepteur naturel d'hydrogène intervenant dans le système aérobie de *E. coli* est l'oxygène lui-même. En effet, d'après les expériences de GALE<sup>14</sup>, la formico-deshydrogénase détache l'hydrogène du formiate et le cède à l'oxygène par l'intermédiaire du cytochrome  $b_1$ . Lorsque celui-ci est éliminé de la préparation enzymatique, l'oxygène ne peut plus remplir le rôle d'accepteur d'hydrogène.

Des résultats analogues ressortent des expériences faites sur les bactéries en croissance: si l'on ajoute à une culture de *E. coli* un accepteur d'hydrogène, l'arrêt de croissance provoqué par le passage d'aérobiose en anaérobiose, est presque complètement supprimé.

Notons qu'en anaérobiose, en présence d'un accepteur d'hydrogène, la pente de la courbe de croissance est différente et toujours plus faible que celle enregistrée en aérobiose, cette pente varie selon l'accepteur d'hydrogène. En présence de fumarate, la courbe de croissance se rapproche fortement de celle observée en aérobiose. Nous ferons remarquer que les expériences précédentes montrent que le fumarate est précisément l'un des meilleurs accepteurs d'hydrogène pour la formico-deshydrogénase.

Dans une culture anaérobie, en absence d'un accepteur d'hydrogène, la présence de l'hydrogénelyase est nécessaire pour la croissance des bactéries. La disparition de l'arrêt de croissance obtenu en remplaçant le mélange  $N_2$  +  $CO_2$  par le mélange  $H_2$  +  $CO_2$  prouve que la phase de latence est due uniquement au manque d'anhydride carbonique et d'hydrogène. Dans des conditions normales l'anhydride carbonique et l'hydrogène sont fournis à la culture par la dégradation du formiate par l'hydrogénelyase. La reprise de la croissance (et l'action du dinitrophénol dans les expériences de FOWLER) s'explique par le caractère adaptatif de l'hydrogénelyase.

Il reste à expliquer pourquoi pendant la phase de latence il n'y a pas de consommation mesurable de glucose. On peut considérer que pendant l'arrêt de croissance les bactéries sont à l'état non proliférant, c'est-à-dire se rapprochent des bactéries en suspension, utilisées dans les expériences exposées au début de ce travail. Or, si l'on refait ces expériences avec un nombre de bactéries plus faible (450  $\gamma$ /ml), comparable à celui existant pendant la période de latence, on n'observe alors aucune consommation de glucose en 30-40 minutes. Durant ce temps (égal à la durée de la phase de latence) et avec les méthodes de dosages employées (SOMOGYI-NELSON ou HAGEDORN-JENSEN) il est donc impossible de mesurer une consommation de glucose, tandis qu'en augmentant de cinq fois environ la quantité de bactéries, on peut facilement mettre en évidence la disparition du glucose.

La consommation de glucose durant la croissance, comme l'a noté Fowler, est toujours plus élevée en anaérobiose qu'en aérobiose. Nous avons montré que ceci est également valable pour les bactéries lavées (Tableau VII). On sait d'ailleurs qu'en anaérobiose il y a toujours plus de glucose disparu qu'en aérobiose, indépendamment de la dégradation ou de l'accumulation du formiate.

TABLEAU VII  
CONSOMMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DE GLUCOSE PAR *E. coli*

Les suspensions *Saf* et *Sap* sont mises respectivement en aérobiose et en anaérobiose. Les prises sont faites à intervalles de temps indiqués dans le tableau.

Temps en heures	Glucose consommé/mg de bactéries	
	<i>Saf</i> Aérobiose	<i>Sap</i> Anaérobiose
1	43 $\gamma$	202 $\gamma$
2	76 $\gamma$	308 $\gamma$
3	94 $\gamma$	405 $\gamma$
4	108 $\gamma$	462 $\gamma$
5	116 $\gamma$	516 $\gamma$

C'est donc au stade final, lors de la dégradation d'acide formique, qu'intervient l'oxygène. Lorsque *E. coli* se développe en aérobiose forcée, l'hydrogène lyase n'existe pas, seule fonctionne le système formico-deshydrogénasique, lequel pour libérer l'hydrogène de l'acide formique exige un accepteur d'hydrogène, qui, chez cette bactérie est l'oxygène. Par contre, lorsque *E. coli* est cultivé en anaérobiose, l'hydrogène lyase apparaît, elle fonctionne sans accepteur d'hydrogène et libère l'anhydride carbonique et l'hydrogène nécessaire à la croissance à partir de l'acide formique.

La formico-deshydrogénase ne fonctionne pas en anaérobiose, même si l'hydrogène lyase est détruite, car l'accepteur naturel d'hydrogène fait défaut.

L'hypothèse énoncée au début de ce travail reste justifiée. Le catabolisme glucidique de *E. coli* est du type fermentaire. Grâce au cytochrome  $b_1$ , l'oxygène, en fixant l'hydrogène provenant du formiate, permet le fonctionnement du système formico-deshydrogénasique et par là du système glucidique à l'air.

Nous remercions le Professeur E. AUBEL pour les conseils et les critiques qu'il a bien voulu nous adresser au cours de ce travail.

Nous remercions également Messieurs A. LWOFF ET J. MONOD pour la discussion approfondie de nos résultats.

*Bibliographie p. 644.*



## RÉSUMÉ

Les suspensions de bactéries lavées, provenant d'une culture de *E. coli* faite en aérobiose forcée, fermentent le glucose sans dégagement d'anhydride carbonique et d'hydrogène et il y a accumulation d'acide formique. Au contraire, les suspensions provenant d'une culture anaérobie, fermentent le glucose avec dégagement de gaz carbonique et d'hydrogène. Ce phénomène est dû à l'absence de l'hydrogénelyase dans les bactéries cultivées sous aération forcée. L'hydrogénelyase est responsable de la dégradation du formiate en anaérobiose. En aérobiose c'est la formico-deshydrogénase, ayant comme accepteur d'hydrogène l'oxygène de l'air, qui dégrade le formiate. En présence d'un accepteur d'hydrogène (fumarate, nitrate ou extrait de levure) les suspensions lavées, provenant d'une culture aérobie, fermentent le glucose avec dégagement d'anhydride carbonique et non d'hydrogène. De même, l'arrêt de croissance, provoqué par passage d'aérobiose en anaérobiose d'une culture de *E. coli*, est supprimé par addition de ces mêmes accepteurs d'hydrogène. On peut également supprimer l'arrêt de croissance en remplaçant l'azote par un mélange  $H_2 + CO_2$ .

## SUMMARY

Suspensions of washed bacteria, originating from a culture of *E. coli* made in forced aerobiosis, ferment glucose without liberating carbon dioxide and hydrogen and there is an accumulation of formic acid. On the other hand, the suspensions originating from an anaerobic culture ferment glucose with liberation of carbon dioxide and hydrogen. This phenomenon is due to the absence of hydrazase in the bacteria cultivated under forced aeration. Hydrazase is responsible for the degradation of formiate in anaerobiosis. In aerobiosis it is formico-dehydrogenase, with the atmosphere oxygen acting as hydrogen acceptor, which degrades the formiate. In the presence of a hydrogen acceptor (fumarate, nitrate or yeast extract) the washed suspensions, originating from an aerobic culture, ferment glucose with the liberation of carbon dioxide and not hydrogen. Also, the stopping of growth, provoked by the passage from aerobiosis to anaerobiosis of a culture of *E. coli*, is suppressed by the addition of the same hydrogen acceptors. The stopping of growth can equally be suppressed by replacing nitrogen by a mixture of  $H_2$  and  $CO_2$ .

## ZUSAMMENFASSUNG

Suspensionen von gewaschenen Bakterien, aus einer in erzwungener Aerobiose gezüchteten Kultur von *E. coli*, vergären Glucose ohne Abscheidung von Kohlendioxyd und Wasserstoff und unter Ameisensäurebildung. Dagegen vergären Suspensionen aus anaeroben Kulturen die Glucose unter Kohlendioxyd- und Wasserstoff-Abgabe. Diese Erscheinung wird auf die Abwesenheit eines Enzyms ("Hydrogènyase") bei den unter künstlicher Lüftung gezüchteten Bakterien zurückgeführt. Dieses Enzym ist für den Ameisensäureabbau bei Luftausschluss verantwortlich. An der Luft ist es die Formico-Deshydrogenase, welche mit Luftsauerstoff als Wasserstoff-Akzeptor, die Ameisensäure abbaut. In Gegenwart eines Wasserstoff-Akzeptors (Fumarat, Nitrat oder Hefeextrakt) vergären gewaschene Suspensionen, welche aus einer aeroben Kultur stammen, die Glucose unter Abgabe von Kohlendioxyd und Wasserstoff. Desgleichen wird der durch den Übergang aus Aerobiose in Anaerobiose bewirkte Wachstums-Stillstand einer Kultur von *E. coli* durch Zugabe dieser selben Wasserstoff-Akzeptoren aufgehoben. Man kann den Wachstums-Stillstand auch aufheben, indem man den Stickstoff durch eine Mischung von  $H_2$  und  $CO_2$  ersetzt.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> E. AUBEL ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 515.
- <sup>2</sup> J. SZULMAJSTER, Thèse de sciences (1949).
- <sup>3</sup> C. B. FOWLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 563.
- <sup>4</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, *Ann. Inst. Pasteur*, 74 (1948) 216.
- <sup>5</sup> J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann, Paris (1942).
- <sup>6</sup> E. AUBEL, M. GRUNBERG-MANAGO ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 442.
- <sup>7</sup> W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS ET J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis (1946).
- <sup>8</sup> M. NICLOUX, E. LE BRETON ET A. DONTCHEFF, *Bull. soc. chim. biol.*, 16 (1934) 1314.
- <sup>9</sup> J. YUDKIN, cité d'après M. STEPHENSON, *Ergebn. Enzymforsch.*, 6 (1937) 139.
- <sup>10</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, J. SZULMAJSTER ET A. PROUVOST, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1690.
- <sup>11</sup> E. AUBEL, A. J. ROSENBERG ET J. SZULMAJSTER, *Compt. rend.*, 222 (1946) 244.
- <sup>12</sup> E. AUBEL ET J. SZULMAJSTER, *Compt. rend.*, 224 (1947) 680.
- <sup>13</sup> E. AUBEL, A. J. ROSENBERG ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 228.
- <sup>14</sup> E. F. GALE, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1012.

Received March 29th, 1952