

الباب الرابع  
التنفس اللاهوائى

Anaerobic Respiration



## الباب الرابع التنفس اللاهوائى

### Anaerobic Respiration

● كما ذكر فى الباب السابق فإن البكتريا الممثلة للضوء photosynthetic bacteria تحصل على طاقتها من الضوء وتنقلها عبر السيتوكروم وأخيراً تخزنها فى صورة ATP ويأتى أيديروجين القوة الاختزالية  $NAD(P)H_2$  من مادة التفاعل وهو مصدر (معطى) خارجى .

«ولكن أغلب الميكروبات تحصل على طاقتها من التفاعلات الكيماوية ولذا تعرف « Chemosynthetic bacteria .

● نظام الحصول على الطاقة فى كلا النوعين من البكتريا متشابه والفرق الأساسى أن الضوء كمصدر لإثارة الالكترونات يحل محله عدد كبير من المركبات الكيماوية كمصدر للطاقة . وبناء عليه يمكن تقسيم الميكروبات الغير ضوئية إلى :

#### ١ - Chemolithotrophs

وهو الميكروبات التى تحصل على طاقتها من أكسدة المواد الغير عضوية .

#### ٢ - Chemoorganotrophs

وهى الميكروبات التى تحصل على طاقتها من أكسدة المواد العضوية .

● توجد ٣ عمليات أساسية فى الأكسدة البيولوجية عموماً :

- نزع الأيديروجين (أو الالكترون) من مادة التفاعل ويتبعه نقله إلى مستقبل مناسب .
- حفظ الطاقة الناتجة من التفاعل السابق .
- التحولات المختلفة لمادة التفاعل المؤكسدة .

- المستقبل النهائى للالكترولون إما يكون الاكسجين فى حالة التنفس الهوائى aerobic respiration أو مركب غير عضوى (خلاف الأكسجين) فى حالة التنفس اللاهوائى anaerobic respiration أو مركب عضوى فى حالة التخمر Fermentation .
- عملية انتقال الالكترولون عبر سلسلة متدرجة الجهد من تفاعلات الأكسدة والاختزال تعرف بسلسلة انتقال الالكترولون (راجع شكل ٢ فى الباب الأول) .
- التنفس اللاهوائى anaerobic or anoxybiontic هى عملية لاهوائية - تتم فى غياب الأكسجين - ولكن باستخدام بدائله حيث أن الميكروبات التى تقوم به تمتلك نظام السيتوكروم وهى لاهوائية اختيارية أو حتمية أحياناً .
- توجد ٤ مجاميع رئيسية من البكتريا التى تستخدم المركبات الغير عضوية كمستقبل نهائى للالكترولون هم :

- أ ( Sulfate reducing bacteria ) وتستخدم  $SO_4^{=}$  .
- ب ( Denitrifying bacteria ) وتستخدم  $NO_3$  .
- ج ( Methanobacterium ) وتستخدم  $CO_2$  .
- د (  $Fe^{3+}$  reducing bacteria ) وتستخدم  $Fe^{3+}$  .

## ١.٤ البكتريا المختزلة للكبريتات او Sulfate respiration

- عدد الميكروبات التى تستخدم الكبريتات كمستقبل نهائى للإلكترون صغير ويطلق عليها Desulfuricants ويمكن تقسيمها كالتالى :

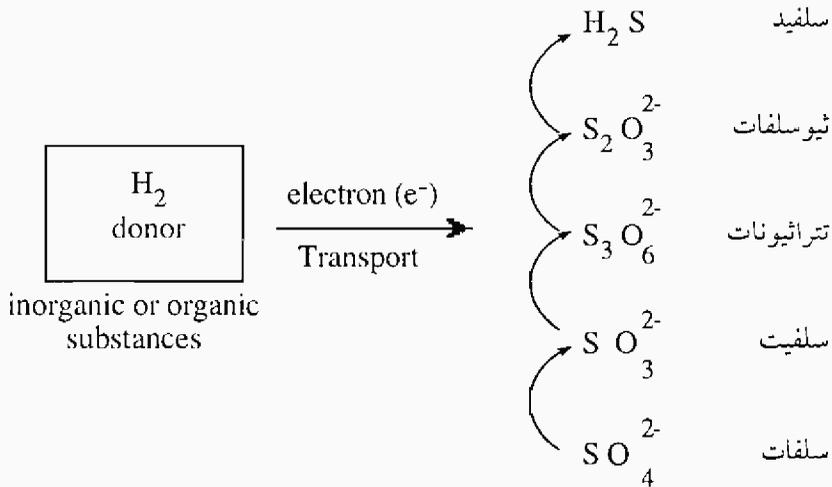
١ - لا تكون جراثيم وتشمل :

- *Desulfovibrio desulfuricans*.
- *Desulfovibrio gigas*.
- *Desulfovibrio vulgaris*.

٢ - تكون جراثيم وتشمل :

- *Desulfotomaculum nigrificans*.
- *Desulfotomaculum orienties*.
- *Desulfotomaculum ruminis*.

وهذه الميكروبات لاهوائية حتمية - تختزل الكبريتات فى وجود معطى للإلكترون (أيدروجين - ثيوسلفات - بيوسلفات - مستخلص خميرة - أيدروجين عضوى - ك أ ٢) .



- إضافة مستخلص الخميرة يحفز النمو ويحتاج الاسيتات ، ك ٢أ لتخليق مادة الخلية ولهذا تصنف هذه البكتريا المختزلة للكبريتات ك Facultative autotrophs or Chemolithotrophic heterotrophs .

- يمكن تقسيم *Desulfovibrio sp.* حسب % G + C لحمض DNA إلى ٣ مجاميع :

الأولى يحتوى على ٦٠ - ٦٢ % ( G + C )

الثانية تحتوى على ٥٤ - ٥٦ %

الثالثة تحتوى على ٤٦ - ٤٧ %

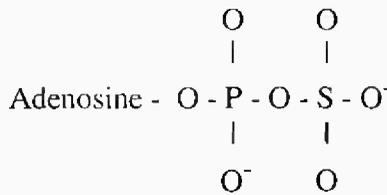
أما *Desulfotomaculum* يحتوى على ٤٢-٤٦ % G + C

#### ١.١.٤ اختزال الكبريتات باستخدام الايدروجين كمعطى للإلكترون

تستطيع بكتريا *D. desulfuricans* اختزال الكبريتات سريعاً فى وجود الأيدروجين والمعادلة العامة هي :



ودراسات الديناميكا الحرارية على الخلايا أو مستخلاصاتها تؤكد أن الاختزال يتم فى عدة خطوات مستخدماً الكبريت العضوى Adenosine 5-phosphosulfate (APS) كمركب وسطي ويظهر الرسم التالي التركيب البنائى له :



التركيب البنائى لمركب ادينوسين فوسفوسلفات (APS)

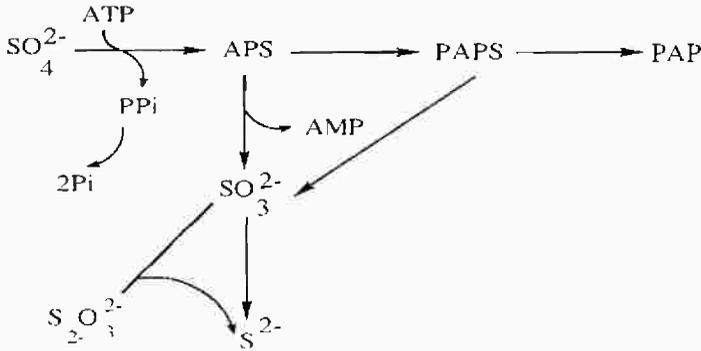
وتكون مثل هذه المركبات الغنية بالطاقة تعنى أن الكبريت يحتاج لنوع من طاقة التنشيط التي تستمد من ATP :



وتعتبر هذه هي الخطوة الأولى في اختزال الكبريتات والتي تؤدي إلى غرضين :

١ - تخليق مركب غني بالطاقة (APS) .

٢ - انفصال  $\text{PPi}$  من  $\text{ATP}$  مما يؤدي لتحليل رابطتين فوسفاتيتين غنيتين بالطاقة حيث يتحول  $\text{PPi}$  سريعاً إلى فوسفات معدني  $\text{Pi}$  والإنزيم الذي يلامس هذه الخطوة هو: sulfate adenylyl - transferase (EC 2. 7. 7. 4)



شكل (٤-١) : اختزال السلفات والثيوسلفات بواسطة *D. desulfuricans*

- أما الخطوة الثانية في اختزال الكبريتات فتتضمن أكسدة جزئ الأيدروجين بواسطة إنزيم hydrogenase قوى جداً يحتاج Fe في أغلب السلالات مما أدى لاكتشاف سيتوكروم  $\text{C}_3$  وهذا السيتوكروم ذائب ، ذاتي الأكسدة autooxidizable ، يقاس عند 419nm ، 523nm ، ذو جهد أكسدة واختزال منخفض 250 mV - ، ونقطة التعادل الكهربائي (IEP) iso electric point عند pH أقل من ١٠ ، يحتوي على ٩ ر. حديد ويعمل كحامل

للالكترون في التفاعلات التي يكون الأكسجين فيها هو المستقبل النهائي (يمكن اختزال أى آثار للأكسجين في البيئة) .



وسيتوكروم  $\text{C}_3$  مسئول عن جهد الأكسدة والاختزال المنخفض المطلوب لنمو Desulfurents حيث تحتاج هذه الكائنات إلى جهد اختزال لا يزيد عن 200 mV - وتوضح المعادلة التالية الخطوة الثانية والتي يعمل فيها  $\text{Cyt. C}_3$  كحامل للالكترون .



والانزيم الذى يلامس التفاعل هو adenylylsulfate reductase (EC 1-2-99.2) وبقية الخطوة الثانية هي اختزال  $\text{Cyt. C}_3$  المؤكسد بملاسة أنزيم hydrogenase وأكسدة الأيدروجين .



- والخطوة الأخيرة هي اختزال السلفيت Sulfite إلى السلفيد Sulfide بملاسة أنزيم Sulfite reductase (EC1.8.99.1) كما يلي :



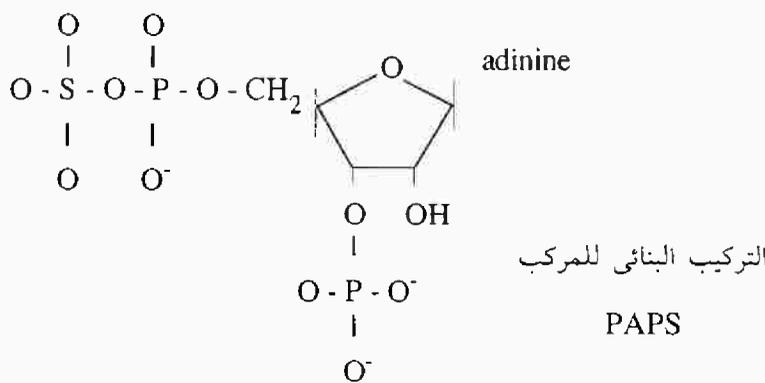
وتمثل المعادلات الأربع عملية اختزال الكبريتات إلى الكبريتيد في وجود  $\text{H}_2$  كمعطى للأيدروجين والتي تحتاج مصدر طاقة ATP (  $2\text{P}/\text{SO}_4^{2-}$  ) لتنشيط السلفات وهذا لا يتأتى من مادة التفاعل أو السلفات أو الأيدروجين والمصدر البديل الوحيد هو الفسفرة المؤكسدة oxidative phosphorylation المقابلة Coupled لاكسدة الأيدروجين .

ويظهر ميكروب *Desulfovibrio gigas* مقدرة على فسفرة ADP المواكبة لأكسدة الأيدروجين بالسلفيت أو الفيومارات كمستقبل للالكترونين حيث يقوم 6-menaquinone بنقل الالكترون بين *Fumarate reductase* , *hydrogenase* .

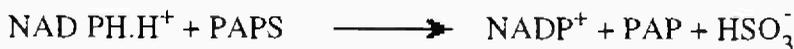
ولقد توصلت الأبحاث الحديثة باستخدام داي نيتروفينول لتشجيع تكون ATPase فى الميكروب السابق لوجود هذه الفسفرة المؤكسدة فى عملية اختزال الكبريتات لاهوائياً ولا ضوئياً حيث يشارك ATPase فى عملية الفسفرة سواء مؤكسدة أو ضوئية فى المستخلصات البكتيرية .

ولهذا يبدو *Desulfovibrio sp* أنه يستطيع القيام بعملية الفسفرة المؤكسدة مثل البكتريا الهوائية ولكن فى وجود سبتوكروم  $C_3$  فقط وهذا كائن فريد النظر فعلاً .

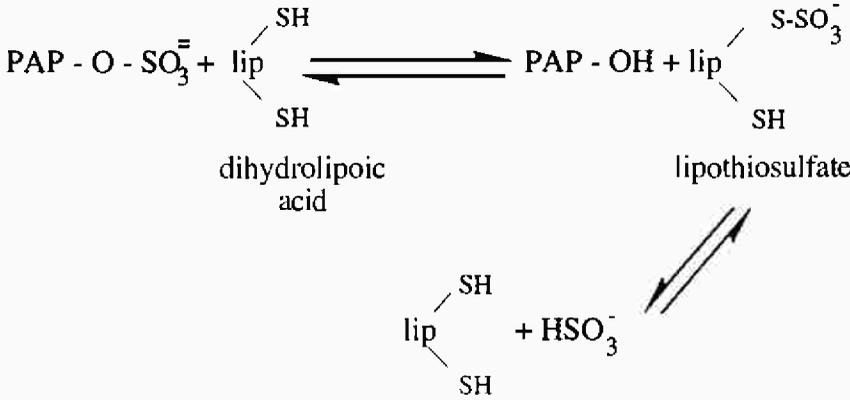
أما فى الخمائر التى تقوم بنفس عملية اختزال الكبريتات فإن الفرق يكون واضحاً لاعتمادها على تكوين المركب PAPS (3- phospho adenosine 5-phospho Sulfate)



ولذا فهى تحتاج - بالإضافة إلى ATP - إلى NADP المختزل أو حمض اللبونيك المختزل كمعطى للأيدروجين والأنزيم المسئول هو (EC 2.7.1.25) adenylyl sulfate kinase الذى ينقل مجموعة فوسفات ثانية إلى APS لتكوين PAPS ثم يحدث الاختزال إلى السلفيت بواسطة  $\text{NADPH.H}^+$  فى وجود أنزيم PAPS - reductase .



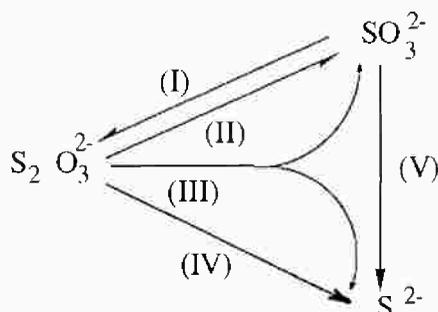
ويعتقد أن هذا الاختزال لمركب PAPS يتضمن مركب وسطى Lipothiosulfate الذى لم يعزل بعد وذلك من خلال التصور التالى :



ووجود هاتين الطريقتين (PAPS , APS) لاختزال السلفات يفرق بوضوح بين الكائنات التى تستعمل اختزال الكبريتات dissimilatory (هدم) عن الكائنات التى تستعملها assimilatory (بناء) حيث الاختزال الهدمى يتم بواسطة الكائنات التى فى حاجة كبيرة لاتمام تنفسها اللاهوائى باستخدام السلفات كمستقبل للإلكترون (Desulfuricants) وكمية السلفيت الناتجة توازى كمية H<sub>2</sub> ، المادة العضوية المهذومة . أما الخمائر ، *E.coli* ، *Salmonella* فلها القدرة على النمو مستخدمة السلفات كمصدر وحيد للكبريت وتستعمل السلفيت أو السلفيد الناتج فى عملية بناء الأحماض الأمينية بها (اختزال بنائى - Assimilatory reduction) .

## ٢٠١٤ اختزال الثيوسلفات فى وجود الأيدروجين

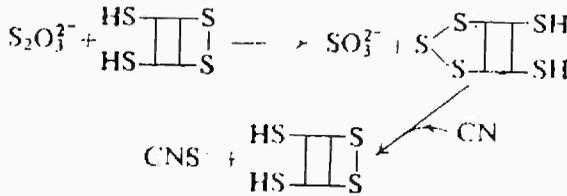
يمكن اختزالها بعدة طرق كما يلى :



شكل (٤-٢) : اختزال الثيوسلفات فى وجود الأيدروجين

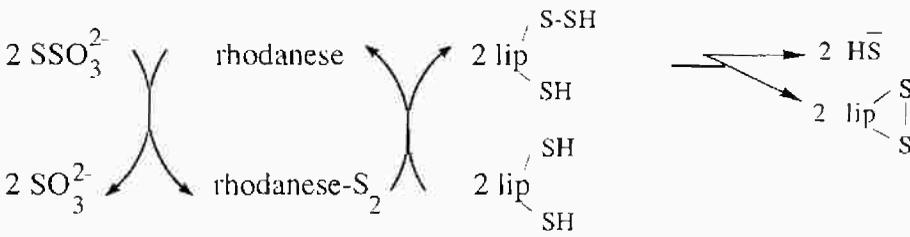
- يستطيع أنزيم Thiosulfate reductase (EC. 2.8.1. 1) اتمام خطوة (III) كما بالرسم السابق بمصاحبة سيتوكروم C<sub>3</sub> لاختزال الثيوسلفات إلى السلفيد (H<sub>2</sub>S) وتكوين السلفيت (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) حيث ذرة الكبريت الخارجية للثيوسلفات تختزل إلى H<sub>2</sub>S وذرة الكبريت الداخلية تتراكم كسلفيت والذى يختزل بعد ذلك إلى H<sub>2</sub>S فى وجود أنزيم Sulfite reductase (EC. 1.8.99.1) [خطوة (V)] أو يمكن إعادته مرة أخرى إلى الثيوسلفات بمساعدة انزيم bisulfite reductase [خطوة (I)] ووجود هذا النظام الانزيمى يسمح للثيوسلفات أن تكون مركب وسطى فى اختزال السلفيت ويجعل الخلية قادرة على التحكم فى مستوى السلفيت الداخلى بها ، والسلفيت نفسه ذو تأثير مثبط على انزيم thiosulfate reductase عند التركيزات المنخفضة نسبياً ويثبط Sulfite reductase عند التركيزات العالية .
- لوحظ أيضاً اختزال مباشر للثيوسلفات خطوة (IV) بواسطة جزئى الأيدروجين فى مستخلص الخلايا لميكروب *Desulfovibrio gigas* وهذا النظام مثل thiosulfate reductase السابق ذكره - يحتاج Ferredoxin ، Flavodoxin كحامل للإلكترون - ولكن لم يعرف بعد إذا كان الانزيمان Thiosulfate or bisulfate reductases متشابهان أم لا .
- ميكروب *Thiobacillus denitrificans* اللاهوائى يظهر سلوكاً آخرأ فى

اختزال الثيوسلفات حيث عزل منــــه انزيم يشبه rhodanese أو thisulfate sulfertransferase (EC. 2.8 1.1) الذى يحول الثيوسلفات إلى السلفيت فى وجود حمض الليبوثيك أو لبيواميد (تفاعل II ) فى الرسم السابق والذى يمكن توضيحه تفصيلا فى الرسم اللاحق .



شكل (٣-٤) : يحول الثيوسلفات لاهوائياً بواسطة *Thiobacillus denitrificans* فى وجود lipoamide

وانزيم rhodanese البكتيرى ينظر إليه كإنزيم قائم بذاته نظراً لخواصه المتفردة ولهذا تحتل موقعاً مؤقتاً فى تحويلات الكبريت . ويمكن تلخص ميكانيكية تفاعله كما بالرسم .



شكل رقم (٤-٤) : كيفية اختزال الثيوسلفات لاهوائياً بمصاحبة انزيم rhodanese

ومنه يتضح انتقال ذرة الكبريت الخارجية فى الثيوسلفات إلى dihydrolipoate عبر انزيم rhodanese مكوناً lipoate persulfide وهو مركب عالى النشاط وينشق مباشرة إلى  $HS^-$  و  $lipoate-S_2$  .

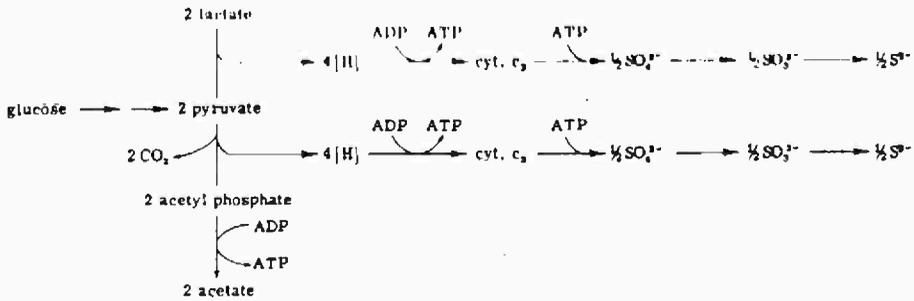
ويشير اكتشاف هذا الانزيم فى *Desulfotomaculum nigrificans* كبروتين منفصل

عن Thiosulfate reductase إلى أن التفاعل المسنول عنه الانزيم موجود بجانب تفاعلات الاختزال الأخرى والأيدروجين هو معطى الالكترون وسلسلة انتقال الالكترونات متماثلة فى تفاعلات اختزال السلفات والثيوسلفات .

### ٣٠١٠٤ اختزال الكبريتات باستخدام المواد العضوية كمعطى للالكترونات

يمكن استبدال الأيدروجين بالعديد من المركبات العضوية كمعطى للالكترون مثل الجلوكوز واللاكتات والبيروفات والنتائج النهائية هو الاستيات ،  $\text{CO}_2$  ،  $\text{H}_2\text{S}$  .

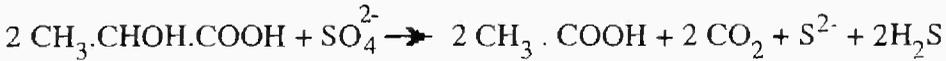
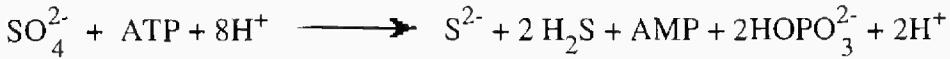
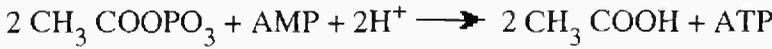
ويستطيع ميكروب *Desulfotomaculum nigrificans* المحب للحرارة العالية التكيف على استخدام الجلوكوز كمصدر للطاقة من خلال دورة EMP ويعتبر واحد من الميكروبات القليلة التى تستخدم دورة Enter-Doudoroff . وعملية هدم المركبات العضوية تنتج الالكترونات اللازمة لاختزال السلفات ، والطاقة اللازمة للنمو . وعملية أكسدة البيروفات تقابلها اختزال الكبريتات كما يظهر من الرسم التالى :



شكل (٤-٥) : اختزال الكبريتات باستخدام المواد العضوية كمعطى للالكترون (تحولات اللاكتات والبيروفات بواسطة البكتريا المختزلة للكبريتات)

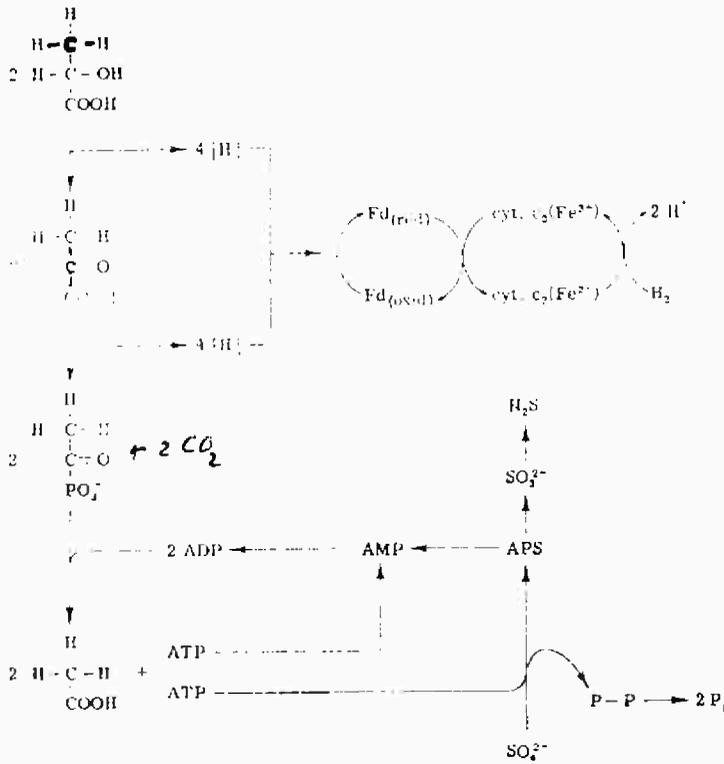
- فى معظم الميكروبات Desulfuricants يتم نزع ك هـ من البيروفات وتحويل إلى استيل الفوسفات ،  $\text{CO}_2$  ،  $\text{H}_2$  ويحتاج هذا التفاعل إلى الفوسفات المعدنى ، Co A وهو يشبه ما يحدث فى تفاعل الفسفرة فى Clostridia كما سياتى ذكره فى الباب التاسع ويعتقد أيضاً أن Thiamine diphosphate مطلوب أيضاً .

- أما ATP المطلوب لتنشيط السلفات أثناء اختزالها فيأتى من تحول استيل الفوسفات إلى الاسيتات ، ATP . وانزيم acetokinase المشارك فى هذا التفاعل متخصص للاسيتات وغير نشط مع الفورمات أو البرويسونات أو البيوترات أو السكسينات ويمكن شرح التفاعل بالتفصيل كالتالى والذى يعرف بعملية نزع ك<sup>٢</sup> المفسرة phosphoroclastic decarboxylation .



- الفيرودكسن ضرورى لعملية نزع ك<sup>٢</sup> أم المصحوبة بعملية فسفرة وأيضاً ضرورى لتنشيط اختزال الكبريتات .

- يمكن تصور تحول اللاكتات عبر البيروفات كما فى الرسم التالى ( شكل ٤-٦ ) ومنه يظهر أن الأيدروجين الناتج يستعمل فى اختزال السلفات كمعطى للأيدروجين بنفس الميكانيكية السابقة الموضحة بالمعادلات السابقة .



شكل (٤-٦) : تحويلات اللاكتات واختزال السلفات بواسطة بكتريا اختزال الكبريتات

- أما سبب التأثير المشجع لـ ATP على تكسير البيروفات فيرجع لتكوين ADP ( كما بالرسم ) الذى يعجل بالتخلص من استييل الفوسفات وإكمال بقية خطوات التفاعل .
- المحصلة النهائية لـ ATP المتكون مشابهة لما يحدث فى اختزال الكبريتات بواسطة  $\text{H}_2$  كمعطى للأيدروجين . حيث ان ٤ أزواج الإلكترونات الناتجة من أكسدة ٢ جزئى استييل فوسفات تستخدم فى تحويل جزئى سلفات إلى سلفيد . وحيث لا يوجد إنتاج حقيقى لـ ATP من فسفرة مادة التفاعل فإن الكائن يحصل على طاقته للنمو من استرة الفوسفات أى الفسفرة المؤكسدة المصاحبة لانتقال الإلكترون من اللاكتات أو البيروفات إلى السلفات .
- والسؤال الهام هو كيف يستطيع ميكروب *Desulfovibrio* استبدال اختزاله للسلفات

باستخدام تفاعل الفسفرة phosphoroelastic reaction التقليدي كما في *E. coli* (راجع الباب التاسع) ؟

هذه الميكانيكية التقليدية تنتج فورمات بالإضافة إلى اسيتيل فوسفات ولكن الفورمات لم تعزل بعد كمركب وسطي في تحولات البيروفات بواسطة هذا الميكروب ويحتمل أن تحول الفورمات يتم - عبر  $Cyt.C_3$  - إلى  $H_2$  ،  $CO_2$  الذي يتبادل بعد ذلك مع البيروفات . وقد عزز اكتشاف انزيم الفورمات ديهيدروجينيز المرتبط على الغشاء الستوبلازمي في ميكروب *D. vulgaris* الدليل على وجود تفاعل فسفرة تقليدي مع Formate hydrogenlyase System . ويرغم أن معظم الفورمات ديهيدروجينيز مرتبطة بـ  $NAD^+$  ،  $NADP^+$  ، Ferredoxin ، Ubiquinone ، إلا أنه ميكروب *D. Vulgaris* يرتبط مع  $Cyt. C_{553}$  . ومن المعروف أن تحول الاسيتيل فوسفات إلى الاسيتات هي خطوة إنتاج الطاقة الوحيدة المتاحة . فإذا كان *D. desulfuricans* تستعمل البيروفات بدون اختزال السلفات فلا بد أن هذا الكائن يستعمل ميكانيكية فسفرة مؤكسدة إضافية للحصول على الطاقة اللازمة لنموه والتي تحدث عند مستوى Fumarase . وقد ثبت مثلاً أن ميكروب *D. gigas* يملك بالفعل انزيمات Fumarase ، التي تلامس هدرجه الفيومارات إلى المالات ونزع ك أ ه المؤكسدة من المالات إلى البيروفات ، ويشير وجود malate dismutation وتحول المالات إلى السكسينات والفيومارات والاسيتات وكذلك وجود Succinate Dehydrogenase إلى أن عدد من *Desulfoviderio* قادر على استخدام جزء من دورة TCA اللاهوائية .

= الخلاصة =

تدل المعلومات المتوافرة عن تفاعلات بكتريا اختزال الكبريت على أنها متعددة القدرات حيث يمكن استبدال اختزال الكبريتات بالأيسدروجين بالعديد من المركبات العضوية والأخيرة تنتج ATP كافي لتحفيز اختزال الكبريتات أو تعمل كمعطي للأيدروجين في عملية الاختزال وتستطيع هذه الكائنات النمو على البيروفات بدون الكبريتات وعندئذ تستبدل الفسفرة المؤكسدة لمركب APS جزئياً بدورة TCA اللاهوائية .

كما أن قدرة الميكروبات المختزلة للكبريتات على أكسدة البيروفات واتمام تفاعل phosphoroelastic reaction من النوع Clostridial Type يعتبر فريداً من نوعه أما في غياب الكبريتات فإن Coli-Type من التفاعل السابق هو السائد .

## ٢٠٤ البكتريا المختزلة للنترات أو Nitrate respiration

- يستطيع عدد كبير من البكتريا اختزال النترات (كمستقبل للإلكترون) مستعملًا الأيدروجين (كمعطى للإلكترون) . والمعادلة العامة كما يلي :



والنتاج النهائى لاختزال النترات هو النتروجين ولكن هناك نواتج وسطيّة ذات أثر كبير فى تلوث البيئة مثل أكسيد النيتروز ( $\text{N}_2\text{O}$ ) ، أكسيد النيتريك ( $\text{NO}$ ) من ناحية التأثير على طبقة الأوزون أو ظاهرة البيوتات الزجاجية (ارتفاع درجة حرارة الكون) .

- أغلب البكتريا المختزلة للنترات Chemoorganotrophs .

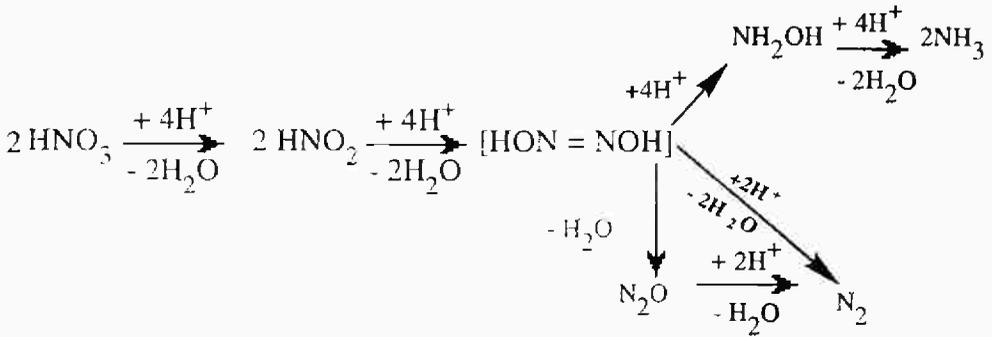
- يوجد نوعين من الانزيمات الميكروبية التى تختزل النترات إلى نيتريت .

(١) assimilatory enzymes التى تحتوى الفلافين والمولبيدنىم ويستخدم عادة  $\text{NAD (P) H.H}^+$  كمعطى للأيدروجين والنتاج هو الأمونيا أو مشتقاتها حيث تدخل فى تكوين مواد الخلية النتروجينية مثل الأحماض الأمينية والبروتين .

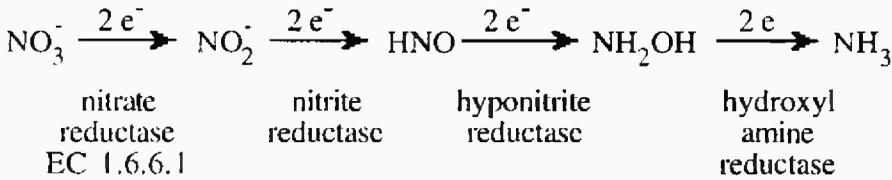
(٢) dissimilatory enzymes التى تحتوى على حديد إضافى وتستخدم النترات كبديل للأكسجين والنتاج هو النتروجين أو أكاسيد النتروجين التى تتطلب للجو وهو ما يعرف بالتنفس التترائى اللاهوائى وهو ما سنتناوله بالتفصيل .

ويعرف التنفس اللاهوائى الذى ينتج عنه تحول النترات إلى النتروجين أو أكاسيد النتروجين أو خليط منهم بعملية الدنترة Denitrification والميكروبات التى يقوم بها Denitrifying bacteria وهى ميكروبات هوائية أو لاهوائية اختيارية تمتلك سلسلة السيتوكروم وتستخدم النترات كبديل للأكسجين .

● شرح المعادلة العامة لاختزال النترات .

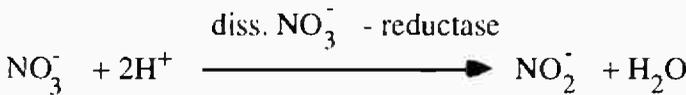


● اختزال النترات إلى أمونيا يحدث به تغيير الكترونى من الحالة المؤكسدة للنترات (5<sup>+</sup>) إلى الحالة المختزلة للامونيا (3<sup>-</sup>) أى زحزحة عدد ٨ الكترونات ولكن لا تنتج عنه أى طاقة أو طاقة ضعيفة والانزيمات المستولة عن استقبال هذه الالكترونات هى كما بالرسم .

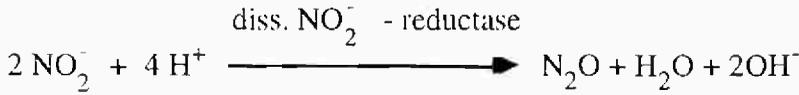


وأكثرهم أهمية وشيوعاً ass. nitrate reductase وهو موجود على السيتوبلازم ويحتوى على الموليبدنم أما انزيم nitrite reductase فيحتوى على Fe-S center ، iron haem (Sirohaem) .

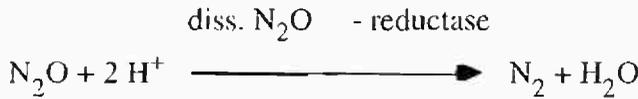
● اما نظام انتقال الالكترونات فى بكتريا الدنترة denitrifiers فأكثر تعقيداً . والخطوة الأولى فى عملية الدنترة هى إضافة عدد ٢ الكترون للنترات لاختزالها إلى النيتريت .



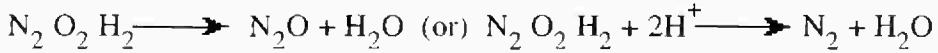
ثم الخطوة الثانية بإضافة ٢ الكترون آخرين لكل ذرة نيتروجين لتكوين أكسيد النيتروز . (N<sub>2</sub>O)



والذى تختزل بواسطة بكتريا الدنترة إلى جزئى النتروجين فى وجود ٢ الكترون اضافيين



أى أن بكتريا الدنترة يمكنها تكوين N<sub>2</sub>O ، N<sub>2</sub> مباشرة من النيتريت لهذا يمكن تصور وجود مركب وسطى هو N<sub>2</sub> O<sub>2</sub> H<sub>2</sub> :



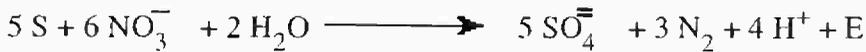
وهذا المركب يتكون من النيتريت بسهولة كالتالى :



#### ١٠٢٠٤ اختزال النترات تحت الظروف الاتوتروفية

#### Chemolithotrophic reduction of nitrate

ويقوم بها ميكروب *Thiobacillus denitrificans* حيث يتحول الكبريت المعدنى أو الثيوسلفات إلى الكبريتات بينما تختزل النترات وتتكون الطاقة ولهذا فهو ميكروب Sulfer-oxidizing autotroph والمعادلة التالية توضح هذا التفاعل .

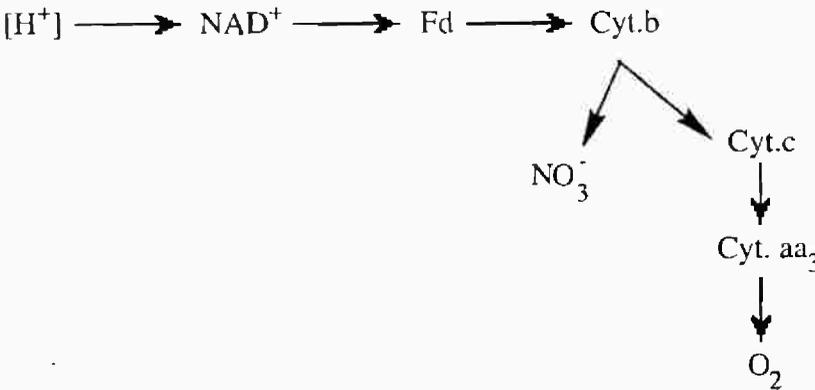


## ٢٠٢٠٤ اختزال النترات تحت الظروف الميترتروفية

## Chemoorganotrophic reduction of nitrate

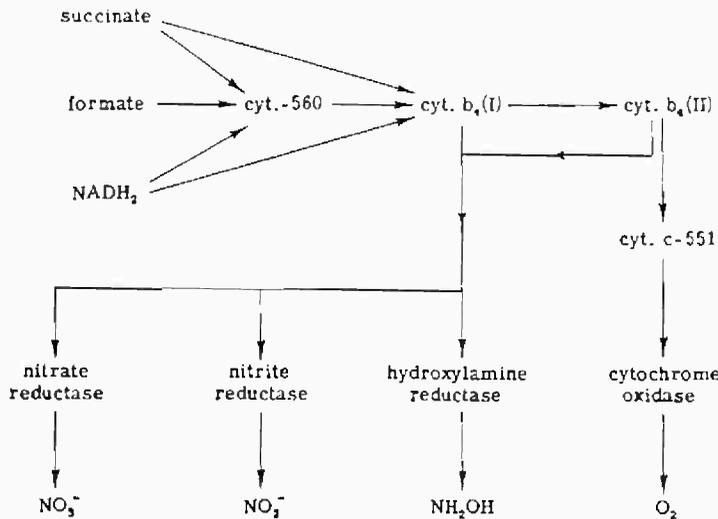
تنمو ميكروبات الدنترة هوائياً أو لا هوائياً اختياراً مستخدمة المواد العضوية أو الأيدروجين كمعطى للإلكترون وتستخدم الأكسجين أو النترات (سواء في غيابه أو وجوده كما ثبت حديثاً) كمستقبل للإلكترون وهي تملك نظام سلسلة انتقال الإلكترونات وتقوم بعملية الفسفرة المؤكسدة لتكوين الطاقة اللازمة لنمو الميكروب في صورة ATP ولكن مازال طول سلسلة انتقال الإلكترونات وأماكن الفسفرة المؤكسدة محل خلاف ، فقد وجد في بعض denitrifiers أنها تملك Cyt.a+a<sub>3</sub> ، Cyt.O ، Cyt.C والمعروف أنه تحت الظروف اللاهوائية الكاملة لا توجد فسفرة في Cyt.C باتجاه O<sub>2</sub> وتحديث الفسفرة لمادة التفاعل المشطة بـ NADH.H<sup>+</sup> في وجود النترات أو النيتريت .

وقد وجد Hohn & Whatly سنة ١٩٧٠ في مستخلص الخلايا أن نسبة  $P : NO_3^- = 1$  في وجود NADH.H<sup>+</sup> (كمعطى للأيدروجين) أما في وجود الكسجينات فقلت إلى  $P : NO_3^- = 0.4$  وقد أثبتنا أيضاً أن انزيم nitrate reductase يتفاعل مع السلسلة التنفسية في منطقة Cyt.b وأن Cyt.C لا يشارك في اختزال النترات أي أن طول سلسلة انتقال الإلكترونات للخلايا النامية هوائياً مع الأكسجين تختلف عن النامية مع النترات كمستقبل للإلكترون وتظهر كما يلي :



ولكن الأبحاث بعد ذلك أشارت إلى أن دخول الإلكترونات يمكن أن يتم عند مستوى كل من Cyt. b ، Cyt. c ، وقد عزل حتى الآن خمس كروموبروتينات هي Cyt. b<sub>4</sub> (I) ،

brown protein ، Cyt. C<sub>551</sub> ، (HR) Cyt. c ، Cyt. b<sub>4</sub> (II) الأوائىل تعمل فى الخلايا النامية هوائياً ولا هوائياً بينما يعمل Cyt. C<sub>551</sub> دوراً مماثلاً لـ Cyt. C فى الثدييات أما البروتين البنى فيعمل كمعطى الكترولن مباشر لانزيم nitrate reductase وهناك دلائل تشير إلى أنه فى الحقيقة صبغة سيتوكرومية تحتوى على heme c ، like heme (d<sub>2</sub>) ويعمل انزيم NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reductase كما بالرسم التالى :

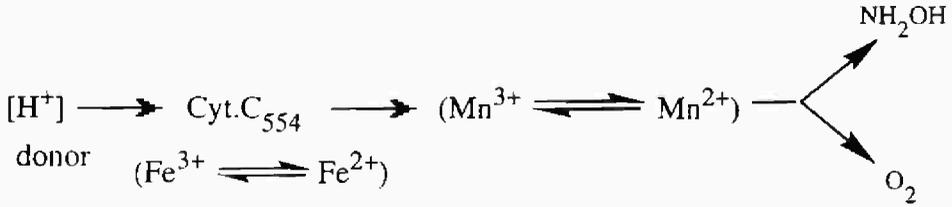


شكل (٤-٧) : سلسلة انتقال الالكترولونات فى التنفس الهوائى واللاهوائى (النترائى) بواسطة ميكروبى *Micrococcus denitrificans* , *Pseudomonas aeruginosa* نقلاً عن Hori (1961)

وتشير الأبحاث الحديثة إلى تفضيل Cyt. C<sub>560</sub> بدلاً من Cyt. b<sub>4</sub> كمنفذ لدخول الالكترولونات حيث وجد أن nitrite reductase يتكون من اثنين من الهيموسيتوكروم يحتويان على C-type ، like heme (d<sub>2</sub>) - وهذاان السيتوكرومان يظهران فقط فى الخلايا النامية لاهوائياً مع النتترات والتيريت كمستقبل للالكترولون . وقد وجد عند تنقية انزيم NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reductase أنه يحتوى نشاط Cyt.c oxidase ولهذا استنتج أن Cyt.c and a<sub>2</sub> يشاركان فى عملية الاختزال كما أن انزيمى NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reductase ، NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reductase يتفاعلان منفصلين وغير مرتبطين ببعضهما .

● أما الانزيم الثالث فى تفاعل الدنترة Denitrification فهو hydroxylamine

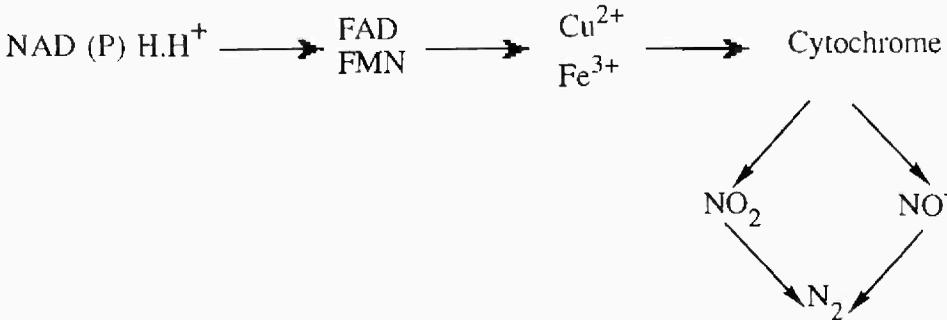
reductase وله القدرة على التفاعل مع الأوكسجين ويمكن تصور دورة في انتقال الالكترولون كما يلي :



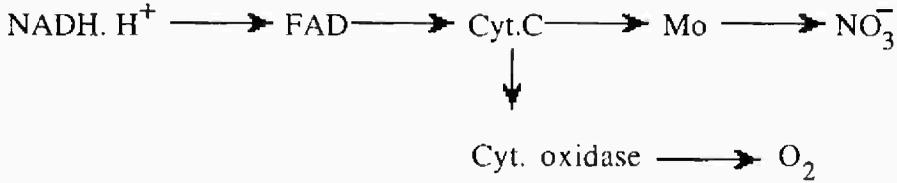
● والملاحظة الجديرة بالذكر أن نقطة التفرع في nitrate reductase هو Cyt.b بينما في كل من nitrite & hydroxylamine reductases تحتاج إلى Cyt.c والتنافس بين التترات والاكسجين يبدو أن سببه سحب الالكترولونات عند مستوى Cyt.b لاختزال التترات .

● كما يبدو أن هناك اختلافاً جذرياً في نظام اختزال التترات والنيتريت بين أفراد بكتريا الدنترة مثلاً *Pseudomonas denitrificans* يختلف عن *Micrococcus denitrificans* حيث لم تشاهد عملية الفسفرة مع النيتريت كمستقبل نهائي للالكترولون مع الميكروب الأول بينما تشاهد في الثاني .

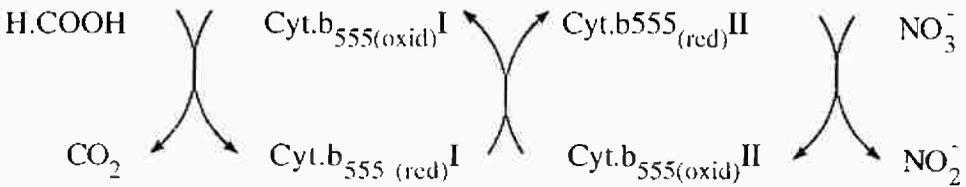
أما ميكروب *Pseudomonas Stutzeri* فيستخدم NAD (P) المختزل كمعطى للأيدروكسين في وجود FAD ، FMN اللذان ينشطان التفاعل ويمكن تصور سلسلة انتقال الالكترولون بهذا الميكروب كالتالي :



بينما يختلف نظام انتقال الالكترون فى جنس *Achromobacter* وكذا فى *Ps. aeruginosa* فى حامل الالكترون قبل الانزيم وفى الاحتياج إلى عنصر الموليبدنم كالتالى .



أما عائلة *Enterobacteriaceae* فالمعروف أنها ميكروبات لاهوائية اختيارية تستطيع القيام بالتنفس اللاهوائى والتخمير وأيضاً بالتنفس الهوائى عند توفر الظروف المناسبة وحسب مستقبل الالكترون المتوافر حيث يمكنها تكوين *nitrate-reductases* وايضاً *Tetrathiosulfate-* ، *Thiosulfate-* ، *Chlorate-reductases* وبالنسبة لاختزالها التترات فإن أنسب معطيات الالكترون هى الفورمات ، السلاكتات ، البيروفات ، *NAD(P)* المختزل كالتالى :



والخلاصة ان ميكروبات الدنترة *Dcnitrifying bacteria* تختلف فيما بينها فى طول سلسلة انتقال الالكترونات وحوامل الالكترونات ومناخذ دخول الالكترونات مما يعطى خصوصية *Kind of Specificity* لهذه الميكروبات مما ينعكس على التركيب النوعى للغازات الناتجة عن العملية فبعضها يكون نيتروجين فقط والبعض أكاسيد نيتروجين والبعض خليط منهم جميعاً .

## ● تأثير الأكسجين :

أعتقد لفترة أن الأكسجين يثبط تكوين انزيمات الاختزال من منابعها البروتينية وظلت مشكلة هل انزيمات الاختزال Constitutive or adaptive ؟ مشار للخلاف حيث تختلف باختلاف الميكروبات إلا أن الأبحاث أشارت إلى أن تأثير الأكسجين لا ينصب على انزيمات reductases ولكن على تكوين السيوكومات التى تحمل الالكترونات للانزيم المختزل . وأظهر مستخلص خلايا *Micrococcus denitrificans* محتوى سيتوكرومى عالى لنوعى b ، C إذا نمت الميكروب لا هوائياً على التترات عن الخلايا النامية هوائياً . وعلى العكس بعض *Staphylococcus* تنتج التريت عند تنميتها هوائياً بينما تفشل فى ذلك أثناء التنمية اللاهوائية مع أن nitrate reductase موجود ولكن يظل بدون عمل أى أن دور الأكسجين فى الأنظمة التنفسية لهذه الميكروبات الاختيارية غير محدد . وربما يلعب وجود heme من عدمه دوراً فى تحويل التفاعل لاتجاه السيتوكروم الخاص باختزال التترات . وعموماً يمكن القول أن كل البكتريا التى تختزل التترات تحت الظروف الهوائية assimilatory تفرز NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-reductase وتحتاج الأكسجين ليس كمستقبل نهائى للالكترون ولكن للتخليق الحيوى للسيتوكروم المحتوى على heme والذى يتوسط فى نظام نقل الالكترون فى عملية الاختزال .

ويعتبر Protoporphyrin IX هو المركب الأساسى (Key) فى عملية تخليق heme حيواً حيث يتفرع لفرعين احدهما يدخل الحديد Fe<sup>2+</sup> لتكوين الهيم والآخر يدخل الماغنسيوم Mg<sup>2+</sup> لتكوين الكلورفيل . ويلعب الهيم دور المجموعة المرافقة Prosthetic group للهيموجلوبين كتاليز ، البيروكسيديز ، وبعض السيتوكرومات والانزيم الذى يحتاج لتدخل (المشاركة) الأكسجين يطلق عليه Oxygenase . ودور الهيم يتلخص هنا فى اتحاده مع مكونات البروتين لسيتوكروم b لتكون Cyt.b<sub>1</sub> الذى يشارك فى نقل الالكترون للتترات بواسطة nitrate reductase .

وبعض البكتريا الهيتروتروفية مثل *E. Coli* يمكنها تخليق السيتوكروم عند تنميتها هوائياً أو لا هوائياً مما يبين أنه ليس كل البكتريا تحتاج الأكسجين لتخليق الهيم . وفى هذه الحالة يبدو أنه يوجد مستقبل الكترونى بديل (لم يعرف بعد) يمكن أن يحل محل الأكسجين لتحويل Co-protoporphyrin إلى protoporphyrin IX ولكن يظل السؤال كيف يتم التحويل فى غياب الأكسجين .

● أهمية عملية الدنترة Denitrification فى الطبيعة :

**مميزاتها**

- تلعب دوراً هاماً فى تحولات التربة والمياه حيث تحول النتروجين التراتى ومشتقاته إلى جزئى نيتروجين ينطلق فى الجو ويكمل دوره النتروجين فى الطبيعة .
- تتخلص من النترات ومشتقاتها بيولوجياً فى مياه الصرف والمجارى المعالجة .

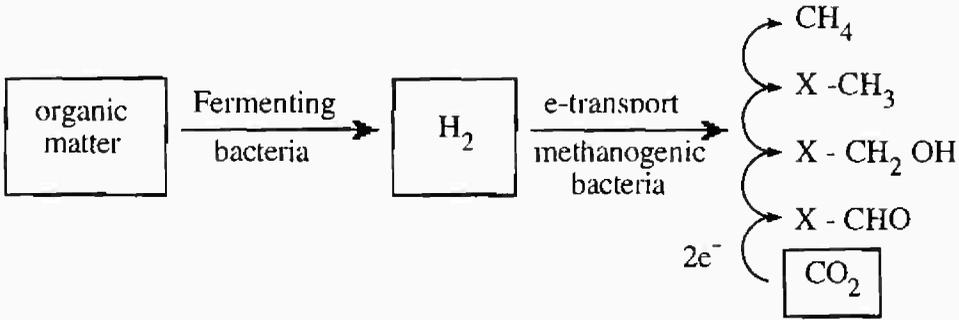
**عيوبها :**

- فقد الأسمدة التراتية المضافة للتربة (خسارة اقتصادية) .
- تكوين النيتريت فى معدة الإنسان حيث تتحد مع هيموجلوبين الدم مكونة methaemoglobin الذى يعيق أكسدة حديد الدم وبالتالي حدوث ظاهرة الأطفال الرضع الزرق (خسارة صحية) .
- تكوين مادة النيتروزامين المسببة للسرطان .
- تكوين أكاسيد النتروجين التى يحتمل أنها تتحد مع طبقة الأوزون فى طبقات الجو العليا مسببة نفاذ الأشعة فوق البنفسجية بمعدلات أكبر من المطلوب مما يؤدى لسرطانات الجلد .
- تكوين أكاسيد النتروجين وتراكمها فى طبقات الجو مسببة ظاهرة البيونات الزجاجية التى تؤدى لرفع درجة حرارة الكون عانياً وما يتبعه من ذوبان الجليد القطبى وارتفاع منسوب البحار وغرق دلتا الأنهار أو تغير خريطة توزيع الأمطار فى العالم .

**٣٠٤ ك أ كمستقبل للالكترونات Carbonate respiration**

**١٠٣٠٤ تكوين الميثان**

- يستخدم ك أ بواسطة مجموعة صغيرة من البكتريا كمستقبل نهائى للالكترون والناجح المختزل هو الميثان وتعرف ببكتريا إنتاج الميثان methanogenic bacteria or methane producing bacteria .



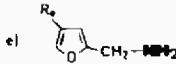
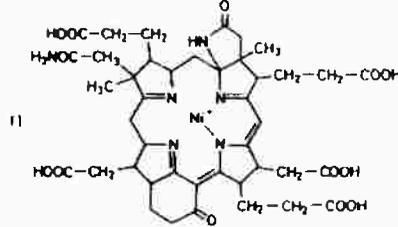
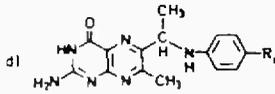
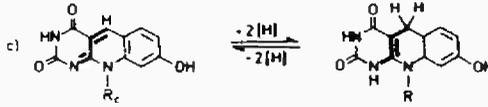
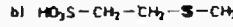
وهي تختلف عن بكتريا أكسدة الميثان الهوائية methane oxidizing bacteria التي تؤكسد الميثان إلى ك<sub>2</sub> أ ، يد<sub>2</sub> أ والتي سيلي ذكرها فيما بعد .

- وبكتريا الميثان ذات شكل عصوي (*Methanobacterium*) أو كروي (*Methanococcus*) أو مكعبي (*Methanosarcina*) أو خيطي (*Methanospirillum or Methanothrix*) وهي تتبع Archaeobacteria التي تختلف عن باقى البكتريا فى عدم احتواء جدرها الخلوية على peptidoglycan ولا تنبسط بواسطة البنسلين وتوجد دائماً منتشرة فى مخمرات محطات معالجة مياه المجارى وهى لا هوائية حتمية بالضرورة ولا تحتوى الكاتاليز .

وعادة تعيش بالاشتراك Close association مع البكتريا المنتجة للأيدروجين حيث تستهلك الايدروجين الذى تنتجه مباشرة والذى يسبب ارتفاع تركيزه سمية للميكروبات المنتجة له أى تبادل منفعة بالاشتراك ولذا تعرف بكتريا إنتاج الميثان بالبكتريا المؤكسدة للأيدروجين H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria .

- كيفية تكوين الميثان والحصول على الطاقة :

يتضمن التحول البيوكيميائى لـ H<sub>2</sub> ، CO<sub>2</sub> إلى الميثان أو للاستيات إلى الميثان ، ك<sub>2</sub> أ العديد من المرافقات الانزيمية و Prosthetic groups والتي لا توجد إلا فى بكتريا إنتاج الميثان مثل methanopterin ، methanofuran ، deazariboflavin (F420) ، Co- ، enzyme M (mercaptoethane sulphonate) ، nickel-tetrapyrid (F430) كما فى شكل ( ٤ - ٨ ) التالى :

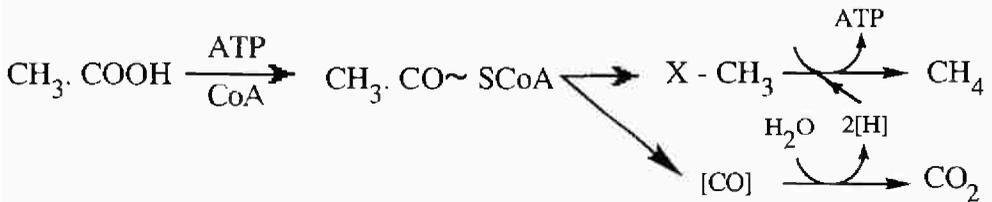


(a) Coenzyme M; (b) methyl-coenzyme M; (c)  $\text{F}_{420}$  (deazariboflavin derivative); (d) methanopterin; (e) methanofuran; (f) factor  $\text{F}_{430}$  (after dissociation of methyl-coenzyme M

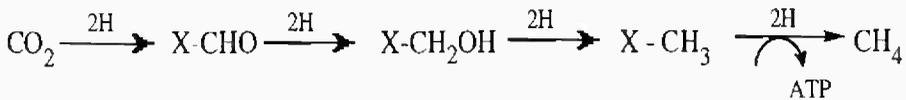
methylreductase). The reactive groups of the compounds (d) and (f) are not indicated.  $\text{R}_{d-e}$ , various side chains consisting of several components.

شكل (٤-٨) : المرافقات الانزيمية ، Prosthetic groups في بكتريا الميثان

ويتكون الميثان من الإستيات كالتالى :



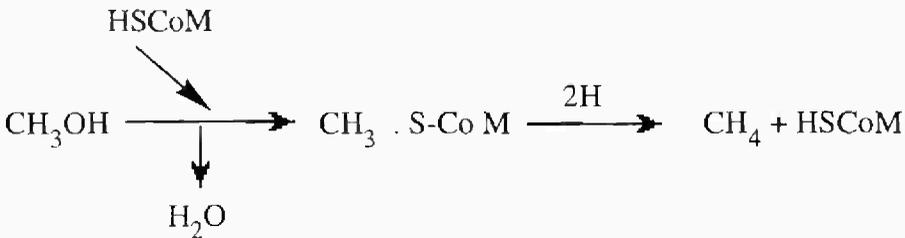
كما يتكون الميثان من ك أ ، يد مباشرة كما بالمعادلة .



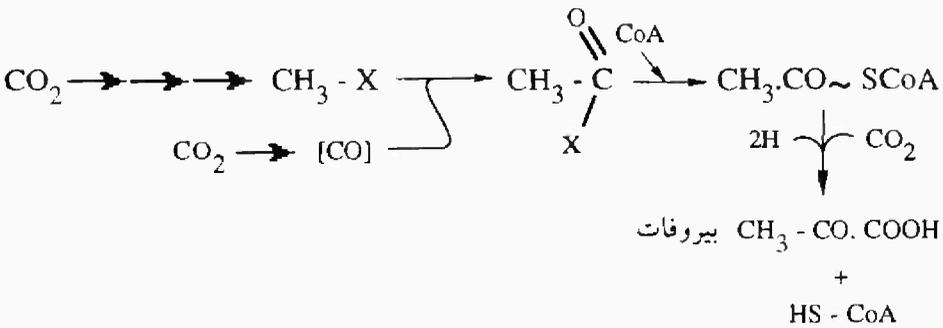
ومازالت ميكانيكية تكون ATP غير ثابتة ماعدا الخطوة الأخيرة حيث ثبت أن لها جهد ثرمو ديناميكي يكفى لتخليق ATP . وأغلب الظن أن التفاعل يصاحبه خروج بروتون من الخلية مما يخلق جهد بروتوني بين جانبي الغشاء ويكفى لحدوث عملية الفسفرة المصاحبة

لانتقال الالكترون . e-transport phosph وتكوين ATP - وليس الفسفرة عند مستوى مادة التفاعل Substrate level phosphorylation - تحت الظروف اللاهوائية وهي صفة مميزة لبكتريا الميثان والذئرة .

وأيضاً يمكن تكوين الميثان من الميثانول والأيدروجين في وجود انزيم methyl transferase الذى يحول الميثانول إلى مثيل كوانزيم M والذى يختزل في وجود انزيم mc-thyl-Co M reductase ويتكون الميثان :



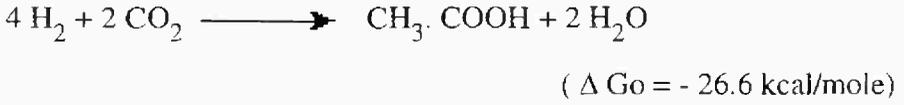
أما تمثيل ك أم اوتوتروفيًا بواسطة بكتريا الميثان لا يتم بواسطة دورة الريبولوز بيوفوسفات ولكن يتم عبر استيل كوانزيم A والبيروفات .



وتفسير ذلك أن ك أم يختزل إلى مستوى الميثانول (CH<sub>3</sub>-X) بينما جزئ آخر من ك أم يختزل إلى ك أ بواسطة الديهيدورجنيز وتحدث عملية Carboxylation لمركب methyl-x الذى يتحول إلى acetyl-x ثم إلى استيل كوانزيم A ويعقب ذلك عملية reductive Carboxylation تؤدي لتكوين البيروفات ومنه يمكن تكوين مركبات الخلية بالدخول فى الدورات الأخرى المعروفة وكذا تكوين ATP اللازم .

### ٢٠٣٠٤ تكوين الاسيتات

وذلك بواسطة مجموعة ميكروبية أو توتروفية تعرف باسم acetogenic bacteria وتوجد فى مخمرات هضم المخلفات وبالذات تحت الظروف الحامضية وذلك باختزال ك أم وأكسدة الايدروجين كما يلى :



وهذه الميكروبات عضويات سالبة لجرام مثل :

*Clostridium aceticum* ، *Cl. thermoacticum*، *Acetobacterium woodii*.

وهى لاهوائية مؤكسدة للأيدروجين Chemolithotrophs ، وتعرف العملية باسم . assimilatory acetate synthesis

وهى تمثل ك أم أوتوتروفيا وتخلق مادة خلاياها من خلال استيل كوانزيم A والبيروفات - مثل بكتريا الميثان - حيث يتم اختزال ك أم إلى methyl-FH<sub>2</sub> عبر الفورمات مع استخدام tetrahydrofolate كمرافق انزيمى . ثم تحدث عملية اضافة ك أم مختزلة لاستيل كوازيم A - كما فى الشكل السابق - ينتج عنه البيروفات الذى يدخل فى الدورات المعتادة .

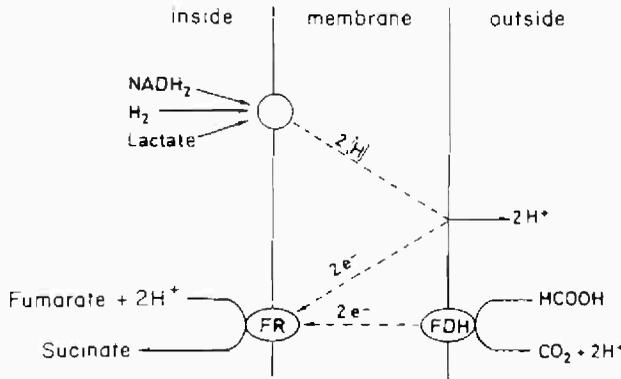
### ٣٠٣٠٤ تكوين السكسينات من الفيومات

تكون السكسينات عادة بواسطة عمليات التخمر ومع ذلك يمكن تكوينها لاهوائيا بمصاحبة e-transport phosphorylation وهى ناتج اختزال الفيومات كما بالمعادلة :



و فرق جهد الأوكسدة والاختزال ( $E_0$ ) بين فيومات / سكسينات عالى نسبياً (حوالى -30 mV) ولهذا تستقبل الالكترونات المحمولة على المرافقات الانزيمية الناقلة للأيدروجين

( $\text{NAD H/H}^+$ ) واختزال الفيومارات يسمح بحدوث الفسفرة المصاحبة لانتقال الإلكترون . ويعرف هذا التنفس اللاهوائي - باعتبار الفيومارات المستقبل النهائي للإلكترون - بتنفس الفيومارات Fumarte respiration وميكانيكته كما بالرسم .



شكل (٤-٩) : تكوين السكسينات من الفيومارات من بواسطة انزيم Fumarte reductase المرتبط بالغشاء نقلاً عن Shlegel, 1986

وواضح من الرسم حدوث جهد بروتوني على جانبي الغشاء السيتوبلازمي وبالتالي إمكانية حدوث عملية الفسفرة وتكوين الطاقة (ATP) .

ويتنشر التنفس الفيوماراتي في كثير من البكتريا اللاهوائية الهيتروتروفية مثال ذلك أجناس *Escherichia* , *Klebsiella* , *Salmonella* , *Proteus* وأيضاً *Vibrio Succinogenes* , *Propionibacterium* حيث لوحظ أن إضافة الفيومارات للبيئة يسبب نمو أسرع وكمية خلايا أعلى والفيومارات يمكن إضافتها خارجياً للبيئة أو أنها تتكون داخلياً من الكربوهيدرات عبر الأكسلاواستيات والمالات .

## ٤٠٤ اختزال الحديدك $Fe^{3+}$ إلى حديدوز $Fe^{2+}$

يمكن لبعض المزارع المختلطة من ميكروبات التربة اختزال الحديدك وذلك فى وجود النترات التى تختزل أيضا لنيترتيت ونيستروجين . ويبدو أن انزيم *nitrate reductase A* يقوم بنقل الالكترتون إلى الحديدك ويختزله إلى الحديدوز وحيث أن اختزال النترات يصاحبه *c-transport phosphorylation* فإنه يمكن حدوث ذلك عند اختزال  $Fe^{3+}$  . وجهد الأكسدة والاختزال  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  حوالى  $E_0 = + 770 \text{ mV}$  يجعل التفاعل ذو ديناميكية حرارية .

وبما أن الحديدك غير ذائب جزئياً ويجب أن تتحول إلى صورة ذائبة وقابلة للنفاذ خلال الخلايا فإن النمو تحت هذه الظروف يكون بطيئاً وضئيل جداً .

## اسئلة للمراجعة

- ١ - ما هو التنفس اللاهوائى ؟
- ٢ - اذكر أربعة من المجاميع البكتيرية الرئيسية التى تستخدم المركبات الغير عضوية كمستقبل نهائى للإلكترون .
- ٣ - اشرح الديناميكية الحرارية لاختزال الكبريتات فى وجود الأيدروجين .
- ٤ - ما هو الفرق بين اختزال الكبريتات فى *Desulfuricants* والخمائر ؟
- ٥ - لماذا يعتبر *Desulfovibrio* ميكروب أوتوتروفى ؟
- ٦ - ما هو الفرق بين اختزال الثيوسلفات فى ميكروبى *Desulfovibrio desulfuricans* & *Thiobacillus denitrificans* ؟
- ٧ - ناقش الدور الذى يقوم به كل من *APS* , *Cyt.C<sub>3</sub>* , *Ferredoxin* فى اختزال الكبريتات بواسطة *Desulfovibrio* .
- ٨ - اشرح كيفية حدوث الفسفرة المؤكسدة تحت الظروف اللاهوائية .
- ٩ - ماذا تعنى عملية الدنترة *Denitrification* وما الفرق بين اختزال التترات *assimilatory & dissimilatory* ؟
- ١٠ - ناقش الديناميكية الحرارية لاختزال التترات .
- ١١ - اشرح أهمية الهيم فى اختزال التترات .
- ١٢ - اذكر أربع أسماء لاجناس البكتريا المنتجة للميثان ولماذا يمكن تسميتها « بكتريا اختزال ك أ<sub>٢</sub> أو بكتريا أكسدة الأيدروجين » ؟
- ١٣ - اشرح كيفية حدوث اختزال ك أ<sub>٢</sub> وتكوين الميثان والحصول على الطاقة .
- ١٤ - اشرح كيفية حدوث التنفس الفيوماراتى وأهم الميكروبات التى تقوم به .

## المراجع

1. Asano, I., Imai, K., and Sato, R. (1967). Oxidative phosphorylation in *Micrococcus denitrificans*. III. ATP supported reduction of  $\text{NAD}^+$  by succinate. J. Biochem. (Tokyo) 62 : 210.
2. Barton, L.L., Le Gall, J. and Peck, Jr. H.D. (1972). Oxidative phosphorylation in the obligate anaerobe, *Desulfovibrio gigas*. In : Horizons of Bioenergetics (A. San Pietro and H. Gest, eds), p. 33-51. Academics Press Inc., New York.
3. Blaylock, B.A. and Stadtman, T.C. (1966). Methane biosynthesis by *Methanosarcina barkeri*. Arch. Biochem. Biophys. 116 : 138.
4. Burton, C.P. and Akagi, J.M. (1971). Observations on the rhodanese activity of *Desulfotomaculum nigrificans*. J. Bacteriol. 107 : 375.
5. Findley, J.E. and Akagi, J.M. (1970). Role of thiosulfate in bisulfite reduction as catalyzed by *Desulfovibrio vulgaris*. J. Bacteriol. 103 : 741.
6. Gray, C.T. and Gest, H. (1965). Biological function of molecular hydrogen. Science 148 : 186.
7. Hadjipetron, L.P. and Stouthamer, A.H. (1965). Energy production during nitrate respiration by *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol. 38 : 29.
8. Hori, K. (1961). Properties of cyt.  $\text{C}_{553}$  and brown protein. J. Biochem. (Tokyo) 50 : 481.
9. Iwasaki, H. and Shidava, S. (1969). Crystallization of cyt.  $\text{C}_{553}$  in anaerobically grown *Ps. denitrificans*. J. Biochem. (Tokyo), 66 : 775.
10. John, P. and Whatley, F.R. (1970). Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in *M. denitrificans*. Biochem. Biophys. Acta. 216 : 342.

11. Lee, J.P., LeGa, J. and Feck, Jr. H.D. (1973). Isolation of assimilatory and dissimilatory sulfite reductases from *D. vulgaris*. J. Bacteriol. 115 : 529.
12. Le Gall, J. and Postgate, J.R. (1973). The physiology of sulphate – reducing bacteria. Adv. Microbial Physiol. 10 : 82.
13. Miller, J.D.A., Neumann, P.M., Elford, L. and Wakerley, D.S. (1970). Malate dismutation by *Desulfovibrio*. Arch. Microbiol. 71 : 214.
14. Newton, J.W. and Komen, M.D. (1961). Cytochromes systems in anaerobic electron transport. In : The bacteria. (I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier, eds). Vol. 2, p. 397. Academic press. New York.
15. Payne, W.J. (1981). Denitrification. John Wiley & Sons, New York.
16. Peck, M.D., Jr. (1968). Energy–coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 22 : 489.
17. Sorokin, Y.I. (1966). Role of CO<sub>2</sub> and acetate in biosynthesis by sulfate reducing bacteria. Nature (London), 210 : 551.
18. Schlegel, H.G. (1982). General microbiology 6th Ed. Cambridge Univ. press, London .
19. Trudinger, P.A. (1969). Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulfur compounds by microorganisms. Advan. Microbial. Physiol. 3 : 111.
20. Wolfe, R.S. (1971). Microbial formation of methane. Advan. Microbial. Physiol. 6 : 107.
21. Yates, M.G. (1967). Stimulation of phosphoroclastic system of *Desulfovibrio* by nucleotide triphosphate. Biochem. J. 103 : 321.