

الباب السادس
التنفس الهوائى

Chemolithotrophic bacteria

الباب السادس

التنفس الهوائى

Chemolithotrophic bacteria

يحتوى التنفس الهوائى على عدد أكبر من العمليات الايضية عن التخمر أو التنفس اللاهوائى .

ولقد اهتمت أغلب الكتب والمراجع الخاصة بهذا الموضوع بدورة حمض الستريك (TCA) كنموذج للتنفس الهوائى . ولكن فى عالم الميكروبيولوجى توجد مجموعة من الميكروبات الغير قادرة على استعمال TCA وتعرف هذه الميكروبات "Chemolithotrophs" وهى أساساً أوتوتروفية وتشتق طاقتها من أكسدة المواد الكيميائية المعدنية فى وجود جزئى الاكسجين كمستقبل نهائى للإلكترون . وتستطيع تمثيل ك_٢ إلى مادة الخلية من خلال دورة كالفن .

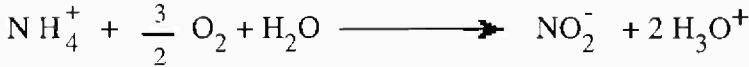
أما الأغلبية الباقية من الميكروبات الهوائية التى تعرف "Chemoorganotrophs" فهى تشتق طاقتها من أكسدة المواد العضوية «كمعطى للإيدروجين» فى وجود الاكسجين «مستقبل الإلكترون» .

وستتكلّم فى هذا الباب بالتفصيل عن Chemolithotrophs وهى عبارة عن عدد قليل من المجاميع البكتيرية القادرة على أكسدة المواد الغير عضوية لتكوين الطاقة وهذه المجاميع هى :

- (١) Nitroso - group التى تؤكسد الامونيا
- (٢) Nitro - group التى تؤكسد النيتريت
- (٣) Hydrogen bacteria التى تؤكسد الايدروجين
- (٤) Fe²⁺ - oxidizing b. التى تؤكسد الحديدوز
- (٥) S- oxidizing bact . التى تؤكسد الكبريت

١٠٦ بكتريا التآزت "Nitroso - group" Nitrifying bacteria

- وهي تتبع عائلة Nitrobacteriaceae وتقع في أجناس *Nitrosomonas* ،
Nitrosospira ، *Nitrosoglea* ، *Nitrosocystis* ، *Nitrosococcus* ،
Nitrosolobus ، ويمكن تنميتها في بيئات معدنية نقية .
- هذه الميكروبات تؤكسد الأمونيا إلى النيتريت تبعاً للمعادلة :



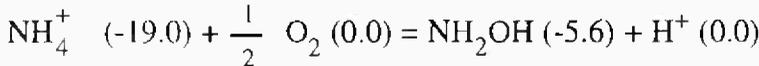
وهذا التفاعل يتضمن انتقال ٦ إلكترونات مسبباً تغير حالة ذرة النيتروجين من -3 إلى +3 وحيث أن الانتقال الإلكتروني العادي يتكون من ٢ إلكترون فإنه تحدث سلسلة من ٣ خطوات تتكون خلالها الطاقة والقوة الاختزالية اللازمة للخلية .

- عند تعرض الخلية إلى hydrazine فإن الأمونيا لا تتأكسد إلى النيتريت ولكن يتراكم هيدروكسيل أمين كمركب وسطي :



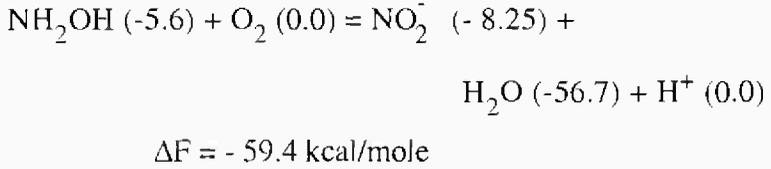
- وهذه الخطوة تحتاج لطاقة endergonic وتلامس بواسطة انزيم monooxygenase .
 وذرة الأكسجين في NH_2OH تأتي من جزئ الأكسجين .

والتغير في الطاقة الحرة (ΔF) عند pH 7.0 تقدر كالتالي :



$$\Delta F = + 13.4 \text{ kcal/mole H}^+$$

- وخطوة أكسدة الهيدروكسيل امين إلى النيتريت تتم فى وجود $\text{Hydroxylamine oxidoreductase}$ (EC 1.7.3.4) وهى تنتج طاقة exergenic كما يلى :

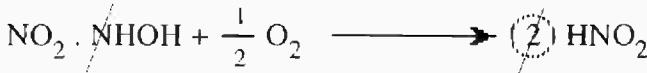


وتحتاج إلى ٤ إلكترونات ولذا لابد من وجود مركب وسطى ذو حالة أكسدة (+1) ولذا اقترح Lee سنة ١٩٥٧ المركب nitroxy (NOH) المشتق من الهيدروكسيل امين بعملية dehydrogenation (نزع الايدروجين) وبرغم أنه غير ثابت ولم يحصل عليه بعد ولكن يمكن أن يستخدم كنقطة تفرع لتكوين النيتريت تحت الظروف الهوائية أو N_2 ، N_2O تحت الظروف اللاهوائية .

ومن ذلك نتبين أن التحول الهوائى للهيدروكسيل امين إلى النيتريت يتم فى خطوتين .

١ - نزع الأيدروجين من الهيدروكسيل وتكوين Nitroxy .

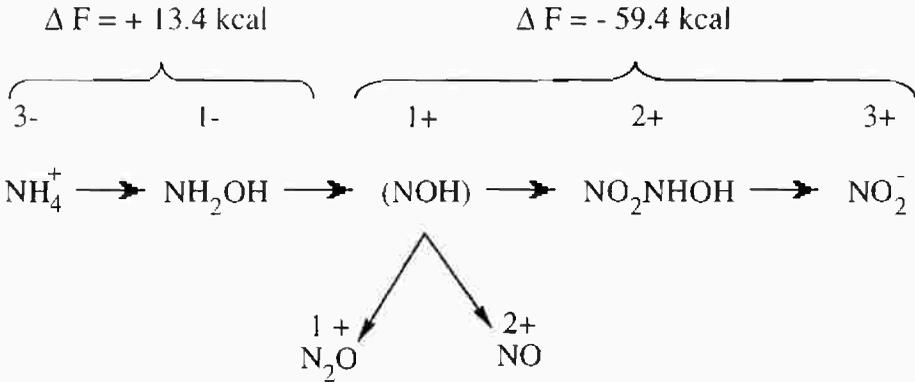
٢ - تحول Nitroxy إلى النيتريت فى وجود انزيم يحتاج الاكسجين كما يتضح ذلك من المعادلات التالية :



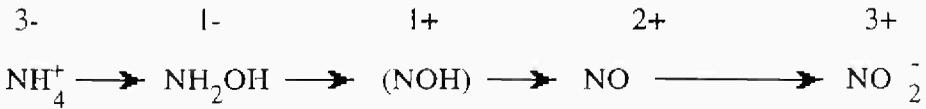
والمركبات الوسيطة بين NOH ، NO₂⁻ فليس هناك تعريف محدد لها بعد مثل N₂O.NHOH المذكور سابقاً والذي يحتاج NO₂⁻ لتكوينه . اما إمكانية اعتبار N₂O كمركب وسطي فقد صرف النظر عنها لحتمية أن المركب الناتج لأن أن يكون عند مستوى أكسدة (+2) وهناك زعم آخر بتكوين المركب (NO) كوسط بينهما .

«وعموماً فإن التصورين المقترحين للمركبات الوسيطة في أكسدة الامونيا إلى النيتريت يمكن تحديدهما كالتالي» .

الاقتراح الأول



الاقتراح الثاني



شكل (٦-١) : العلاقة بين المركبات الوسيطة في أكسدة الامونيا بواسطة *Nitrosomonas*

- وتستطيع هذه الميكروبات استخدام ك أم كمصدر كربوني وحيد للنمو وتمثيله إلى مادة الخلية عبر دورة كالفن وهذه الميكانيكية عكس التنفس . وبما أن ك أم ذو حالة مؤكسدة أعلى بكثير جداً من بقية المواد العضوية فإنه يحتاج إلى قوة اختزالية في صورة NADH.H⁺ لاختزاله وتثيته . وحيث أن جهد الأكسدة والاختزال لنظام NH₂OH / NH₄⁺ مقارنة بنظام NAD⁺ / NADH.H⁺ عالى جداً (-320 mV) مقارنة بنظام NO₂⁻ / NH₂OH (حوالي +66 mV) . فإنه في (حوالي +394 mV) أو بنظام NO₂⁻ / NH₂OH (حوالي +66 mV) . فإنه في

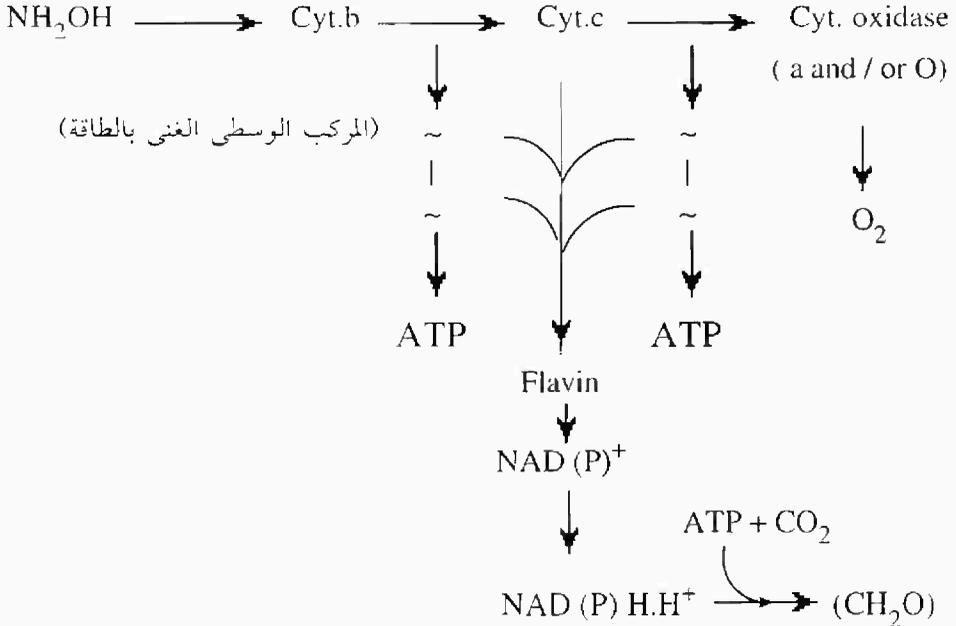
الحالتين الاخيرتين لا تستطيع الالكترونات الانتقال من أكسدة الامونيا أو الهيدروكسيل امين إلى $NAD(P)^+$. وهذه المشكلة تعتبر صفة مميزة لكل الميكروبات Chemolithotrophs .

ولهذا يعتقد أن هناك انسياب الكترونى عكسى من $Cyt. C Fe^{2+}$ إلى NAD^+ أو $NADP^+$ فى وجود الفلافوبروتين . وهذا النظام يحتاج لطاقة والتى تأتي اما بأكسدة الهيدروكسيل امين أو بواسطة ATP خارجى كما بالمعادلة .



حيث أن AH_2 يمكن أن يكون هيدروكسيل امين أو سكينات أو حتى Cyt.C مختزل . وقد لوحظ أن أكسدة ٢ مول من Cyt.C المختزل ضرورية لاختزال امول من NAD^+ باستخدام طاقة ٥ مول من ATP وتشير إلى ٤٠ ٪ من كفاءة التفاعل المرتبط بالطاقة .

ويمكن تصور سلسلة انتقال الالكترون وتكوين المواد الغنية بالطاقة والتى تستخدم فى تثبيت ك أ٢ فى Nitroso - group كما يلى :



شكل (٦-٢) : انتقال الالكترون العكسى فى *Nitrosomonas sp.*

ومن الرسم يتضح أن تخليق ATP يتبع e-transport phosphorylation وأنه يحدث انسياب عكسى للالكترولون إلى NAD^+ (وليس للأكسجين) وأن ATP الناتج يستخدم فى اختزال CO_2 وتكوين مادة الخلية .

- أهمية عملية التأزت Nitrification :

١ - تحويل الامونيا الناتجة من معدنه المواد العضوية النيتروجينية إلى نيتريت ونترات . وهذا التحول من الصورة الكاتيونية إلى الصورة الانيونية يؤدي لزيادة حموضة التربة وبالتالي زيادة تيسر وذوبان المعادن (P ، Mg ، Ca ، K) أى تلعب دوراً هاماً فى خصوبة التربة .

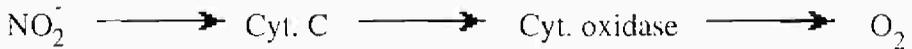
٢ - الامونيا أكثر أو إدمصاصا على حبيبات التربة والذبال بينما النترات سهل غسلها وفقدتها بالرشح لذا تستعمل مثبطات لنمو بكتريا التأزت مثل N-Serve .

٣ - تشارك بكتريا التأزت بطريق غير مباشر فى الامطار الحمضية وفى تحطيم الحجارة الجيرية والأسمنت فى الطرق والمباني بسبب أكسدة الأمونيا فى الجو إلى حمض النيتريك المذيب القوى .

٢٠٦ بكتريا التأزت "Nitro"- group

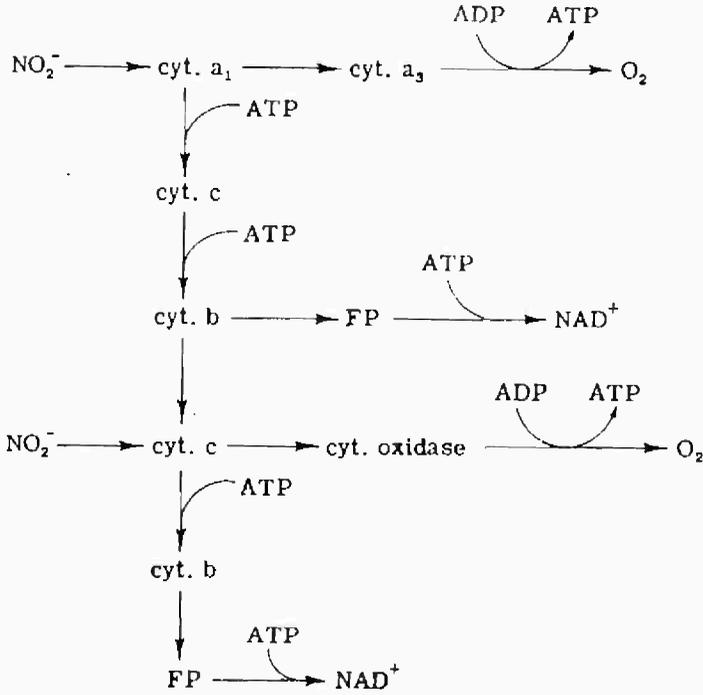
وتتضمن جميع أنواع البكتريا التى تستطيع أكسدة النيتريت إلى النترات مثل اجناس *Nitrobacter* ، *Nitrococcus* ، *Nitrospira* ، *Nitrocystis* .

- خطوة أكسدة النيتريت إلى النترات لا تتضمن مركبات وسطية - مثلما الحال فى أكسدة الامونيا إلى النيتريت - وفيها يتحول النيتروجين من تكافؤ +3 إلى +5 فى وجود الاكسجين كمستقبل نهائى للالكترولون .



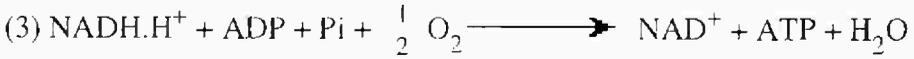
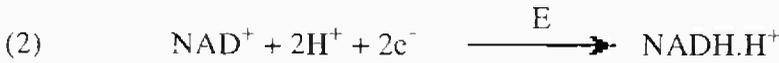
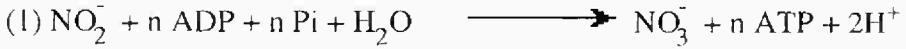
وحيث أن Cyt. C لميكروب *Nitrobacter* ذو جهد أكسدة وإختزال حوالى + 265 mV مقارنة بـ + 420 mV لنظام NO_3^- / NO_2^- ولذا لابد من طاقة تنشيط حوالى 15 Kcal للدخول الالكترولونات عند مستوى Cyt. C . أى أن دخول

الالكترونات الناتجة من أكسدة النيتريت عند مستوى Cyt. C مشكوك فيه وإنما يتصور دخول الكترونات عند مستوى Cyt. a₁ وعندئذ يحدث انتقال الكتروني عكسي منشط بالطاقة من Cyt. a₁ لاختزال Cyt. C ويظهر الرسم التالي كلا الاحتمالين .



شكل (٦-٣) : نظام انتقال الكترونات العكسي في *Nitrobacter* sp.

- وقد أمكن إثبات أن الماء - وليس جزئى الأكسجين - يدخل فى أكسدة NO_2^- إلى NO_3^- وأن معطى الأيدروجين لاختزال NAD^+ هو الماء أيضاً وذلك باستخدام $^{18}\text{O}_2$ والماء الثقيل H_2O^{18} . فالنيتريت يعطى الكترونات أولاً إلى السيوكروم (سلسلة انتقال الكترون) كما فى تفاعل (١) والتي تستقبل فى النهاية بواسطة جزئى الأكسجين (تفاعل ٣) ويقابل ذلك تكوين ATP كما تظهر ذلك المعادلات التالية :



جزء من الطاقة المتكونة (E) يحتاج فى تفاعل "2" حيث يختزل NAD^+ ومصدر الالكترونات فى تفاعل "2" هو المادة المختزلة مثل السيتوكروم بينما مصدر البروتون هو الماء . ويبدو من نظام انتقال الالكترون فى *Nitrobacter* أن مشكلة تكوين القوة المختزلة (NADH_2) يشابه ما كان فى *Nitrosomonas* . بمعنى أن اختزال NAD^+ بواسطة النيتريت يمكن أن يحدث اما على حساب ATP المضاف خارجياً أو بواسطة الطاقة المتولدة من أكسدة عدة مولات من النيتريت . ويحتاج اختزال امول من NAD^+ بواسطة النيتريت إلى استخدام 4-5 مول ATP .

وتتركز معظم التساؤلات حول كيفية التغلب على الفجوة الثروموديناميكية thermo dynamic gap بين $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ والسيتوكروم C . والإجابة تكمن ربما فى تكون معقد من مادة التفاعل مع Cyt. C reductase النشط جداً مسبباً جهداً سالباً أعلى من مادة التفاعل ، وجزء من هذا المكون المعقد هو هدرجة النيتريت أو اشتراك مكون فوسفاتى غنى بالطاقة بما يتجاوز هذا الـ gap .

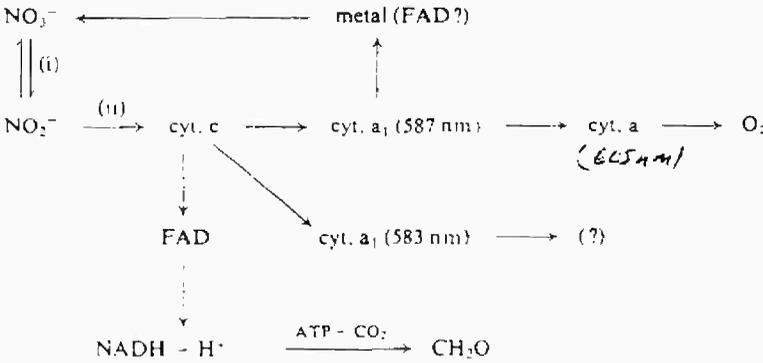
وبصرف النظر عن تصورات دخول الالكترونات إلى سلسلة الانتقال فإن *Nitrobacter* يمتلك موقعا واحداً فقط للفسفرة المؤكسدة عند مستوى Cyt. oxidase أو Cyt. a_3 . ويستخدم جزء من الطاقة المنطلقة فى اختزال ك_أ وتمثيله والجزء الآخر فى تكوين NAD (P) المختزل . وثبت أن أكسدة امول من النيتريت يعطى تقريباً 17.5 Kcal طاقة ميسرة يدخل جزء منها فى تكوين ATP .

وقد اكتشف Schön سنة ١٩٦٥ أن تثبيط أكسدة النيتريت عند تركيز الاكسجين العادى ليس بسبب تراكم NO_2^- وليس من تأثير الاكسجين على عملية الاكسدة ولكن من تأثير الاكسجين على تمثيل ك_أ حيث وجود ٩٥ ٪ أكسجين (حجمياً) يشبط عملية تمثيل ك_أ تماماً فى ميكروب *Nitrobacter winogradsky* . وفى نفس التجربة وجد أن

انخفاض الاكسجين الذائب إلى $2 \text{ mg O}_2 / \text{L}$ (حوالي ٢٧ ٪ من التشبع) كان كافياً لنمو *Nitrobacter* بينما التركيز الأدنى لميكروب *Nitrosomonas* كان $0.9 \text{ mg O}_2 / \text{L}$. وعموماً فمن قياسات الاكسجين الذائب والتغير في التروجين المعدني يمكن استنتاج أن النسبة المثلى للنمو كانت 1 : 3.22 في حالة أكسدة الامونيا إلى النيتريت بينما كانت 1 : 1.11 في حالة أكسدة النيتريت إلى النترات .

وهذا الفصل بين تحولات الطاقة وبين تمثيل ك أ_١ يؤيد أن *Nitrobacter* يمتلك سلسلة تنفسية (Cyt. c, b, a and a_١) التي تعمل غير مرتبطة بتكوين القوة الاختزالية وبالتالي تمثيل ك أ_١ .

وتشير سلسلة انتقال الالكترونات في الرسم التالي إلى أن الالكترونات تنتقل من السيتوكروم البكتيري C إلى مكوني Cyt. a_١ (درجة امتصاصهما عند 583 nm ، 587) ومن Cyt. a_١ (587 nm) تنتقل الالكترونات اما مباشرة إلى النترات في وجود FAD أو خلال Cyt. a (605 nm) إلى الاكسجين في وجود الموليبدنم .



شكل (٦-٤) : سلسلة انتقال الالكترونات في *Nitrobacter Winogradaskyi*

وميكروب *Nitrobacter agilis* لا يؤكسد النيتريت فقط ولكن يملك انزيمات NO_2^- ، NO_3^- reductases ، $\text{NH}_2\text{OH}-$ تحت الظروف اللاهوائية حيث يختزل النترات إلى الامونيا وهذا لا يجعل الميكروب denitrifier حيث لا يكون جزئ N_2 ، وإنما يعتبر اختزال نترات بنائي assimilatory حيث تدخل الامونيا في تكوين

الأحماض الامينية ومادة الخلية وهذا يختلف الطبع عن اختزال النترات الهدمى dissimilatory فى عملية الدنتره Denitrification .

كما أن ميكروبات التآزت *Nitrobacter* ، *Nitrosomonas* تستطيع اختزال الكبريتات assimilatory حيث تختزل الكبريتات عبر APS ، PAPS ويمتلك انزيمات Sulfate adenytransferase ، adenytransferase kinase ، PAPS-reductase مثلما الحال فى *E. coli* ، Yeasts .

أيضاً يستطيع *Nitrobacter* تمثيل عدد كبير من المركبات العضوية وعلى سبيل المثال الاسيتات الذى ينفذ خلال الغشاء الخلوى ويعمل كمصدر للكربون بدلاً من ك_أ . حيث تمثل الاسيتات إلى poly-β-hydroxy butyrate وزيادة النيتريت تزيد تمثيل الاسيتات بوضوح اما فى غياب النيتريت فالميكروب يحول الاسيتات ببطء إلى ك_أ ، يد_أ . وكل انزيمات TCA موجودة بالكائن وأضافة النيتريت يزيد تمثيل الاسيتات assimilation إلى مادة الخلية . ووجود الاسيتات والكازين المسمى لا يفقد الميكروب إطلاقاً قدرته على النمو الاوتوتروفى على النيتريت ، ك_أ . ويظل متوسط محتواه من C+G فى DNA حوالى 61.2 ± 1% سواء نمى الميكروب اوتوتروفيا أو هتروتوفيا .

أيضاً ثبت أن ميكروب *Nitrobacter agilis* يحتوى على Formate oxidase الذى يؤكسد الفورمات إلى ك_أ ، يد_أ . أما النمو على الفورمات كمصدر وحيد للكربون لم يثبت معملياً جدواه .

٣٠٦ بكتريا أكسدة الايدروجين

Hydrogen bacteria (Knallgas bacteria)

وهى البكتريا التى لها القدرة على أكسدة الايدروجين فى وجود الاكسجين كمستقبل للالكترونات مع تثبيت ك_أ عن طريق دورة الريبولوز بيوفوسفات (دورة كالغن) والمعادلة العاملة لذلك .

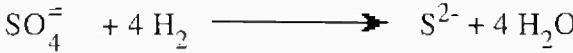


وهى بكتريا عصوية أو كرويه موجبة أو سالبة لجرام تقع فى أجناس مختلفة تقسيمياً مثل *Alcaligenes* ، *Aquaspirillum* ، *Paracoccus* ، *Pseudomonas* ، *Xanthobacter* (السالبة الجرام) ، *Nacordia* ، *Bacillus* ، *Mycobacterium* (الموجبة الجرام) وهذه البكتريا mixotroph أى لها القدرة على النمو اتوتروفيا او هيتروتروفيا ولكنها هوائية حتمية وبعضها يستخدم بدائل الاكسجين كمستقبل للالكترونات مثل النترات والكبريتات والكربونات (تنفس تحت ظروف لاهوائية) ومن أمثلة ذلك .

Paracoccus denitrificans



Desulfovibrio vulgaris



Methanobacterium sp



وليس هنا مجال الحديث عن التنفس اللاهوائى حيث سبق شرحه فى الباب الرابع .
ولذا فالحديث مقصور على التنفس الهوائى باستخدام الاكسجين كمستقبل للالكترونات .

- أثناء تنمية بكتريا الهيدروجين فإنها تستهلك $\text{H}_2/\text{O}_2/\text{CO}_2$ بنسبة - ١ : ٢ : ٦ لتثبيت ك أم كما بالمعادلة العامة المذكورة سابقاً وذلك فى وجود Hydrogenase لتنشيط جزئى الايدروجين . والقوة المخزنة NADH_2 وكذا ATP اللازمين لعملية تثبيت ك أم يتحصل عليهما من الفسفرة المؤكسدة e-transport phosphorylation .
- اثبتت الدراسات على مستخلص *Hydrogenomonas* H16 ان نشاط انزيم hydrogenase يمكن فصله إلى جزء ذائب وآخر مرتبط والجزء الذائب يلامس اختزال NAD^+ بواسطة جزئى الايدروجين ولا يحتاج إلى Co-factors وهذا الجزء يتأثر تأثيراً

طفيفاً بتراكم ATP ، $NADH.H^+$ ولا يتفاعل مع O_2 ، $NADP^+$ ، FMN ، FAD أو أزرق الميثيلين . والانزيم الذائب يكفى لتزويد الخلية بالقوة المختزلة $NADH_2$ وأيضاً ATP اللازمين لاختزال ك أم .

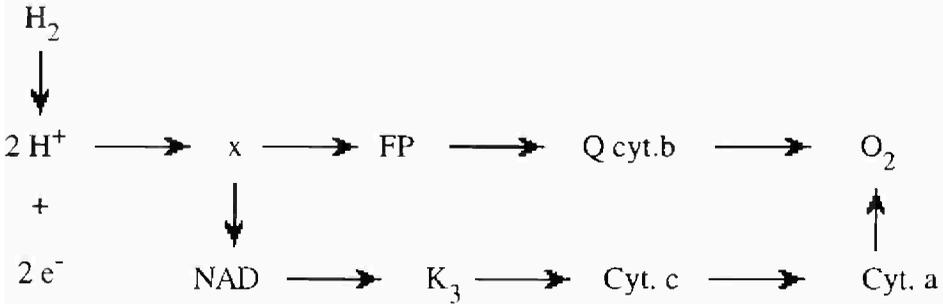
أما الجزء الثانى فمرتبط بالغشاء ويختزل أزرق الميثيلين والاكسجين كمتقبل فيولوجى للايدروجين . وهو يدخل فى سلسلة انتقال الالكترونات التى تلازم الفسفرة المؤكسدة وهناك بعض الدلائل على وجود $NADH_2$ - oxidase (EC 1.6.99.3) الذى يلامس أكسدة $NADH.H^+$.



أى أنه يمكن القول أن بكتريا أكسدة الايدروجين بها نوعين من انزيمات Hydrogenases لهما وظيفتين مختلفتين مثل البكتريا الفوتوثروفية . احدهما مرتبط (Particulate) بعملية فسفرة ADP إلى ATP والثانى (Soluble) ينقل الالكترونات إلى الاكسجين عبر $NADH_2$.

وأغلب الميكروبات تحتوى على الانزيم المرتبط بينما *Nacordia* تحتوى على الانزيم الذائب فقط فى حين اعداد قليلة نسبياً من الميكروبات تمتلك كلا الانزيمين مثل *Alcali-gins eutrophus* .

ويمكن تصور نظام انتقال الالكترونات وأكسدة $NADH_2$ كما بالرسم .



شكل (٥-٦) : نظام انتقال الالكترونات فى *Hydrogenomonas eutropha* النامية تحت ظروف اتوتروفية

- ويعتقد أن الفسفرة المؤكسدة للايدروجين تتحدد فى الخطوات ما بين H_2 ، Cyt. b .
وباعتبار ك ΔF كمصدر وحيد للكربون والهيدروجين كمعطى وحيد للالكترونات فإن
تفاعلات الطاقة لميكروب *Hydrogenomanas* تتبع المعادلة التالية :



ومن قياسات الطاقة يتبين أن امول H_2 ينتج ما يعادل ٢ مول ATP . ويحتاج ٥ مول
ATP لتحويل امول ك ΔF إلى مادة الخلية أى يحتاج ٥ مول H_2 لتمثيل ٢ مول
ك ΔF .

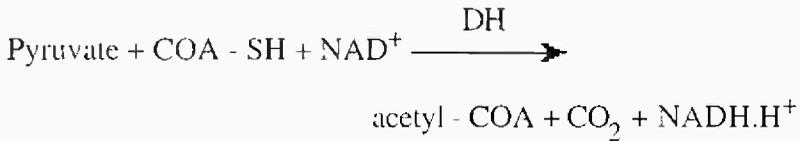
وبكتيريا الايدروجين قادرة على تخليق حامض بولى هيدروكسى بيوتيريك ليس فقط
هتيروتروفيا من البيروقات والاسيتيات ولكن اوتوتروفيا من ك ΔF من خلال دورة
كالفين .

ولقد افترض Schlegel سنة ١٩٦٦ التصورين التاليين :

(١) يتكون اسيتيل كوانزيم A من ٣ - فوسفو جليسرات عبر البيروقات وتفاعل
نزع ك ΔF Decarboxylation .

(ب) يتكون اسيتيل كوانزيم A من الفركتوز ٦- فوسفات أو الريليلوز ٥ - فوسفات
عبر تفاعل (PK) phosphoketolase .

وحيث أنه لا يوجد تفاعل PK فى بكتريا الايدروجين فإن الافتراض الأول هو الطريقة
الوحيدة الممكنة والانزيم الذى يلامس هذا التفاعل هو بيروفات ديهيدروجينير
(EC 1.2.4.7) .



- وتمت الظروف الهيتروتروفية فإن بكتريا الايدروجين تستخدم دورة حمض الستريك (TCA) كمصدر تخليق ATP وسحب اسيتيل كوانزيم A من هذه الدورة لتخليق بيتاهيدروكسى بيوترات سيكون على حساب تخليق ATP حيث لن تعمل دورة TCA بطريقة مثلى .
- وعموماً اسيتيل كوانزيم A المتكون عبر النمو الاتوتروفى أو الهيتروتروفى لبكتريا الايدروجين يحدث له عملية Carboxylation إلى malonyl CoA الذى يدخل فى تكوين بولى هيدروكسى بيوترات . وتكوين المألونات يبدو كخطوة أولية لتخليق الليبيدات أو البروتينات فى وجود مصدر N . وسرعة تكوين هيدروكسى بيوترات أسرع بكثير تحت الظروف الهيتروتروفية عن الاتوتروفية .
- وتستطيع بكتريا الايدروجين استخدام بعض الكربوهيدرات كمصدر للكربون مثل الجلوكوز والفركتوز والريبوز والجلوكونات . وتتم تحولات الجلوكوز عبر دورة 6-phospho gluconate انزيم (ED) Entner & Doudoroff ، ويدل وجود انزيم dehydrogenase فى بعض بكتريا الايدروجين على حدوث نشاط عن طريق دورة HMP .
- "Hydrogen effect" وهى ظاهرة تطلق على التأثير المثبط لجزئ الايدروجين على تكوين الانزيمات لدورة ED مما يسبب نقص فى معدل النمو أو تكوين هيدروكسى بيوترات بنسبة ٨٠ ٪ . وتستطيع بكتريا الايدروجين تكوين البولى فوسفات تحت الظروف الهوائية من الارثوفوسفات ودورها يبدو لتزويد الخلية بالفوسفات (مركب تخزين) .
- وعموماً يمكن اعتبار أن تمثيل العناصر الغذائية العضوية لتكوين مادة الخلية اما الطاقة اللازمة لعمليات التخليق فتشتق من أكسدة الايدروجين .

٤٠٦ بكتريا أكسدة الحديد Iron-Oxidizing bacteria

تتم تحولات الحديد الميكروبية من خلال طريقتين :

- ١ - الكائنات المتخصصة التى تؤكسد أيون الحديدوز إلى الحديدىك كمصدر للطاقة مثل بعض الطحالب الخضراء المزرقه وبكتريا الحديد الحقيقية مثل :

Ferrobacillus ferrooxidans , *Gallionella* , *Thiobacillus ferrooxidans*

٢ - بواسطة الميكروبات الغير متخصصة والتي تستطيع تحويل بعض المواد العضوية المحتوية على الحديدوز وينطلق الحديديك فى صورة $Fe(OH)_3$ أو يخلب داخل غلاف الخلية Cell Sheaths .

وسيكون الحديد تفضيلاً عن المجموعة الأولى التي تؤكسد الحديد كمصدر للطاقة .

ميكروب *Ferrobacillus ferrooxidans*

- المعلومات المتاحة عنه محدودة ربما بسبب نقص الطرق المناسبة للحصول على نموات كافية منه . حيث يلزم لإنتاج ١-٢ جرام خلايا حوالى ١٨ لتر بيئة .

- يشتق الميكروب طاقته من التفاعل التالى :



$$\Delta F = - 40 \text{ Kcal / mole}$$

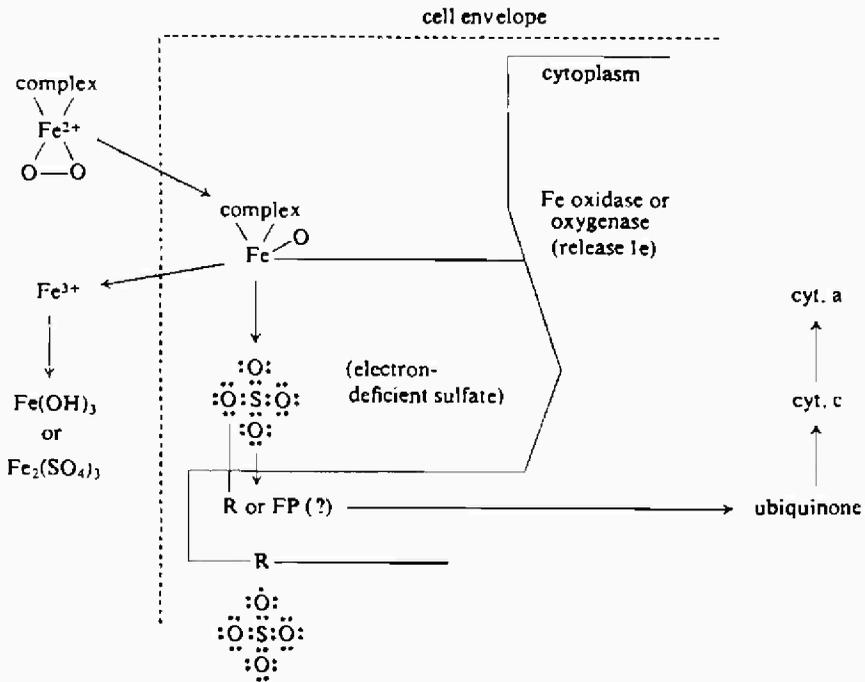
ومثل باقى Chemolithotrophs فإن مشكلة تكوين ATP والقوة المختزلة $NAD(P)H_2$ تظل قائمة . وتعلل الدراسات الأولية لـ Aleem & Lee سنة ١٩٦٣ ذلك بحدوث انتقال الكترونى من Ferro Cyt.C إلى NAD^+ فى مستخلص الخلايا . وثبت أنه يحتوى على سيتوكرومات a ، b ، c وأن :

$$Em \text{ of } Fe^{2+} / Fe^{3+} = 770 \text{ mV}$$

وهذا الجهد ينقص عندما يرتبط الحديد مع انيون مثلاً الاكسالات حيث جهد اكسالات الحديد يصل تقريباً إلى الصففر عند pH حوالى 7 . . ويمكن أن يكون التفاعل الانزيمى للسيتوكروم C مع ايون الحديدوز تفاعل منتج للطاقة كما هو الحال مع انزيم iron-Cyt.C reductase (EC 1.9.99.1) الذى له القدرة على نقل الالكترون من ايون الحديدوز إلى سيتوكروم C .

- ويصاحب أكسدة الحديدوز إلى الحديديك تكوين حمض الذى هو عادة حمض الكبريتيك . ولذا عند وضع أى تصور لأكسدة الحديد فلا بد أن يوضع فى الاعتبار

الاحتياج إلى SO_4^{2-} وكذا دخول Fe^{2+} لداخل الخلية أو بقاؤه مرتبطاً على سطحها وهذا يقودنا للتصور التالي :



شكل (٦-٦) : أكسدة الحديدوز بواسطة *Ferrobacillus Ferrooxidans* ويلاحظ ارتباط السلفات مع مجموعة R (فلافو بروتين)

ومن الرسم يتضح أنه يتكون أولاً معقد حديد - أكسجين والحديد في هذا المعقد oxygenated وليس oxidized حيث لم يحدث انتقال للإلكترون . وهذا المعقد يتكون اما في المحلول أو على سطح الخلية حيث يتفاعل مع Fe - oxi- (oxygenase) dase وينطلق الكترولون الذي ينتقل إلى الخلية عبر السلفات أو الفلافوبروتين (FP) ثم عبر ubiquinone إلى Cyt. C ومنه لـ Cyt. a وأخيراً إلى الاكسجين كمستقبل نهائي . بينما يتأكسد الحديدوز إلى الحديديك وينطلق في صورة ايدروكسيد أو كبريتات الحديديك ويعتقد أن خطوة انتقال الالكترولون إلى Cyt. C يقابلها خطوة فسفرة كما في اجناس *Nitrosomonas* ، *Nitrobacter* .

- وتتكون القوة المختزلة H_2 (P) NAD فى خطوة انسياب الكترولنى عكسى لأنه لا يمكن تكون معقد حديد ذو جهد أكبر من (Em - 320 mV) لنظام $NAD^+ / NADH.H^+$. وهذا يعنى وجود نفس سلسلة انتقال الالكترولن السابق شرحها فى *Nitrosomonas* (شكل ٦-٢ السابق).
- ويستطيع ميكروب *F. ferrooxidans* النمو أيضاً على الكبريت المعدنى وأكسدة النيتريت .
- وأثبتت الدراسات الحديثة ان *F. ferrooxidans* ليس اوتوتروفى حتمى ولكنه اختياري . حيث بعد فترة تأقلم على الجلوكوز يستطيع الميكروب النمو على الجلوكوز وأيضاً على المانيتول وبعض السكريات الأخرى .
- وتحولات الجلوكوز الهوائية بواسطة الميكروب تتم عبر دورة EMP - حيث لم يكشف وجود ٦- فوسفوجلوكونات ديهيدروجينيز - ثم يكمل تحوله عبر دورة TCA . ونظام الهدم هذا يعدل نظام انتقال الالكترولن حيث تستطيع الالكترولونات دخول السلسلة التنفسية عند مستوى $NAD^+ / NADH.H^+$. ولإعادة تكوين الأحماض ثنائية الكربوكسيل المستخدمة فى أغراض التخليق الحيوى فإنه الميكروب يمتلك أيضاً انزيم phosphoenolpyruvate Carboxylase الذى يعمل كـ anaplerotic enzyme فى تكوين الاكسالواسيتات ولا تستطيع البيروفات ولا حتى البيروفات المرتبطة بـ ATP ان تحل محل فوسفوانبول بيروفات (PEP) وينشط انزيم PEP - Carboxylase بواسطة اسيتيل كوانزيم A ويثبط بواسطة الاسبارات asparate . وتشير كل الدلائل على أن الميكروب ليس mixotroph بل ينمو اوتوتروفيا وبعد التأقلم على الجلوكوز يصبح هتيرتروفيا .

ميكروب *Thiobacillus ferrooxidans*

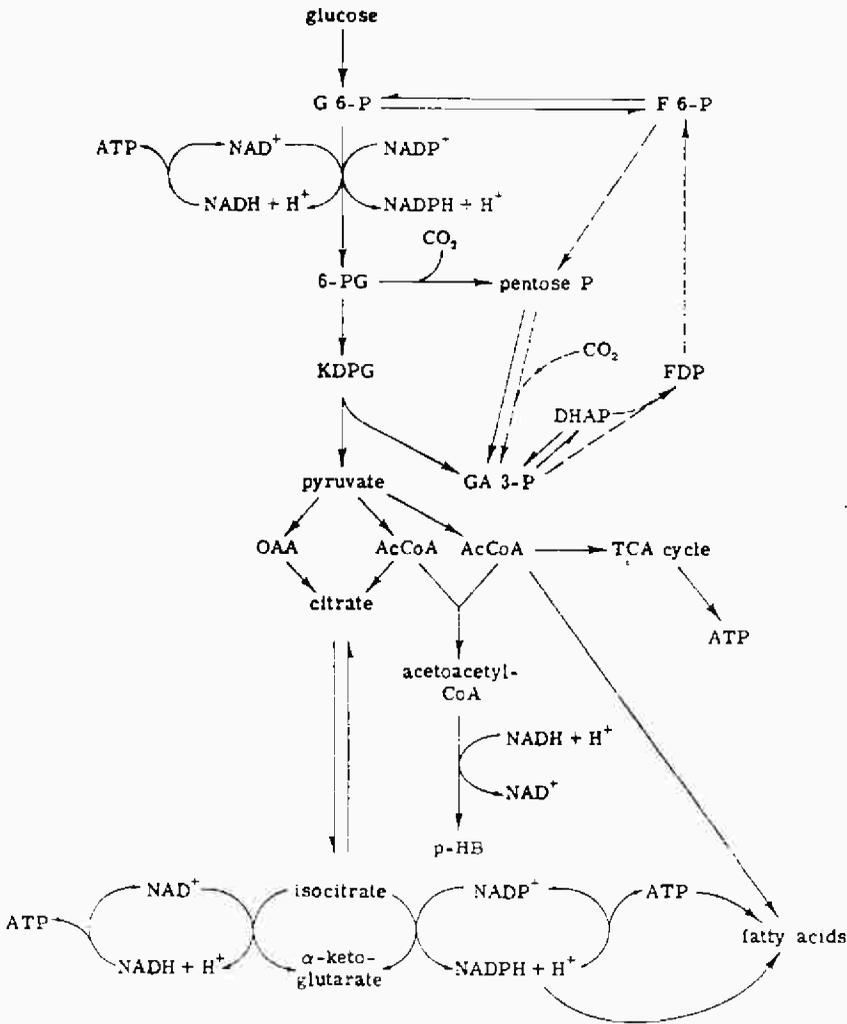
يعطى الاحتياج للكبريتات وتأثير الفوسفات ومعدل أكسدة الحديد بعض الانطباع ان التحولات الانوتروفية لهذا الميكروب تشابه مع سابقه *Ferrbacillus ferrooxidans* مع اختلاف هام وهو قدره الميكروب على أكسدة مركبات الكبريت المختزلة مثل H_2S بالإضافة

لأكسدة الحديدوز . ومعدل أكسدة مركبات الكبريت أقل بكثير عن معدل أكسدة الحديدوز . وبحسابات المولر فإن الميكروب يستطيع أكسدة ١٨٠ مول حديدوز تقريباً فى نفس الوقت الذى يحتاجه لأكسدة امول كبريت . وهناك فرق آخر بينما تستطيع *F. ferrooxidans* استخدام الجلوكوز عبر دورة EMP ولا تستطيع النمو mixotroph فإن *Thiob. ferrooxidans* يهدم الجلوكوز عبر دورة ED مثل بكتريا الايدروجين وتستطيع النمو mixotrophically .

وفى تجربة باستخدام جلوكوز [C^{14}] وجد أن انزيمات دورة ED يزداد نشاطها إذا نعى *Thiobacillus ferrooxidans* على بيئة تحتوى الحديد والجلوكوز أو الجلوكوز فقط . والخلايا النامية تحت ظروف هيتروتروفية لها القدرة على اتمام دورة TCA كاملة بينما الخلايا النامية اوتوتروفيا تفتقد انزيمات ∞ - كيتو جلوتارات ديهيدروجينيز ، NAD_2 -oxidase . كذلك وجود نوعين من isocitrate dehydrogenases ذو أهمية حيث الانزيم المرتبط بـ NAD^+ هو Constitutive ومسئول عن انتقال الالكترونات بينما الانزيم المرتبط بـ $NADP^+$ هو adaptive للنمو الهيتروتروفى ويستخدم لأغراض التخليق الحيوى .

أما إعادة تكوين الأحماض ثنائية الكربوكسيل اللازمة لتخليق الأحماض الامينية أو الدهنية فيستخدم انزيم Pyruvate Carboxylate وليس PEP-Carboxylase . كما يشير المستوى المنخفض من انزيم Fructose diphosphate aldolase إلى أن دورة EMP تستخدم فقط عكسياً (gluconeogenesis) لأغراض التخليق الحيوى .

وبناء على كل الاعتبارات السابقة فإن تصورات التحولات الايضية التى يقوم بها ميكروب *Thiobacillus ferrooxidans* يمكن تلخيصها فى الرسم التالى :



شكل (٧-٦) : النمو الأوتوتروفي (---) والنمو الهيتروتروفي (—)

والتحولات الأيضية في ميكروب *Thiobacillus ferrooxidans*

نقلًا عن : Tabita & lundgren, 1971

G 6-P: glucose 6-phosphate; F 6-P: fructose 6-phosphate; 6-PG: 6-phosphogluconate; KDPG: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; DHAP: dihydroxyacetone P; OAA: oxalacetate; p-HB: poly β -hydroxybutyric acid; GA 3-p: glyceraldehyde 3-p; FDP: fructose diphosphate.

- ومن الملاحظات الجديرة بالذكر التى يمكن استخلاصها من الرسم السابق الأتى :
- وجود تفاعل Transaldolase - Transketolase مما يشير لإمكانية حدوث دورة HMP أيضاً .
 - وجود انزيم جلوكوز ٦- فوسفات ديهيدروجينيز المرتبط بالمرافقات الانزيمية NAD^+ ، $NADP^+$ ويعتبر مفتاح (key) دورتى HMP ، ED ويمكن تثبيطه بواسطة NAD المختزل وكذا ATP . ولا يشاهد تأثير allostery له بعكس بكتريا الايدروجين . .
 - ولم يعرف بعد هل لذلك دخل فى وجود كلا الدورتين (ED , HMP) فى *Thiob. ferrooxidans* بينما دورة ED فقط فى بكتريا الايدروجين .
 - ميكانيكية تنظيم regulatory mechanism للنمو الاتوتروفى أو الهيتروتروفى لم تكتشف بعد وربما يلعب glucose 6 - DH ، iso citrate DH دوراً هاماً فى ذلك .
 - انتقال الالكترن تحت الظروف الهيتروتروفية بسيط جداً :



وتتكون خلاله كل ATP المطلوب .

بكتريا الحديد الغير متخصصة Other iron bacteria

يستطيع عدد من البكتريا أكسدة الحديدوز ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) وأيضاً مركبات المنجنيز ($Mn^{2+} \rightarrow Mn^{4+}$) وترسيبها فى أغلفتها Cell Sheath . وهى تقع فى أجناس عديدة ووضعها التقسيمى غير مستقر للآن ومن أمثلتها :

Leptothrix discophorus

Leptothrix ochracea, Sphaerotilus natans

وهى ميكروبات تنمو فى سلاسل طويلة مرتبطة ببعضها بغلاف رقيق Sheath ولذا تبدو خيطية ولها القدرة على تكوين بولى - بيتا هيدروكسى بيوتيرات عند إضافة الجلوكوز للبيئة . ويزداد معدل تكوين البولر فى وجود ايونات المنجنيز والمغنسيوم اما الكالسيوم فتحتاجه فى تكوين الغلاف .

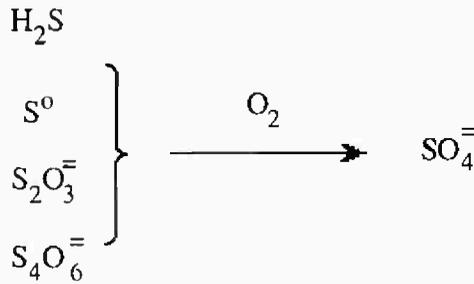
ومن الأجناس الأخرى لبكتريا أكسدة الحديد :

Siderocapsa, Siderophaera, Siderobacter, Sideromonas

ومن أهم الأجناس *Gallionella* وقد اكتشف حديثاً قدرته على تمثيل ك أم أوتوتروفيا من خلال دورة الريبيلوز بيوفوسفات وامتلاكه لانزيم Ribulose biphosphate carboxylase ولذا وضع فى مجموعة Lithotrophic bacteria .

٥٠٦ بكتريا أكسدة الكبريت Sulfer - Oxidizing bacteria

- تحصل على الطاقة من أكسدة مركبات الكبريت المعدنية لتكوين الكبريتات كنتاج نهائى .



- وهى تقع فى عدة أجناس حسب الشكل المورفولوجى والصفات الفسيولوجية والبيئية .

1 - *Thiobacillus*

2 - *Thiospira*

3 - *Thiomicrospira*

4 - *Thiospheara*

5 - *Thiovulum*

6 - *Acidophilium*

ومنها الخيطية الشكل مثل : *Thiothrix, Thioplaca, Beggeatoa spp.*

- ومنتشر وجودها فى ماء البحر والتربة ومياه المجارى والعيون الكبريتية وأغلبها هوائية حتمية ما عدا بعضها الذى يستخدم بدائل الاكسجين مثل النترات والحديدك (تنفس لاهوائى) .

- أهم أجناسها *Thiobacillus* ومعظم أنواعها Species اوتوتروفية حتمية مثل

T. thioparus ، *T. neapolitanus* ، *T. thiooxidans* وبعضها mixotrophs
مثل *T. perometabolis* ، *T. intermedius* ، *T. novellus*

ولعمل تصور عام للتحويلات الايضية لهذه الميكروبات توجد عقبتين :

أ - نوع المركب الكبريتى الذى سيتأكسد حيث يوجد ثيوسلفات ، ثيوسلفيت ، الكبريت المعدنى ، الكبريتيد .

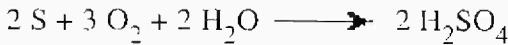
ب - مشكلة التفاضيه كما نوقشت فى بكتريا الحديد .

وبالنسبة للعقبة الأولى فقد قسمت إلى أربع طرق :

(١) أكسدة الثيوسلفات إلى التتراثيونات والذى يتأكسد إلى الكبريتات كما فى
: *T. thiooxidans*



(٢) أكسدة الثيوسلفات أولاً إلى الكبريت والذى يتأكسد إلى الكبريتات ويمثلها
: *T. thioparus*



(٣) أكسدة الثيوسلفات مباشرة إلى الكبريتات ويمثلها *T. novellus* .

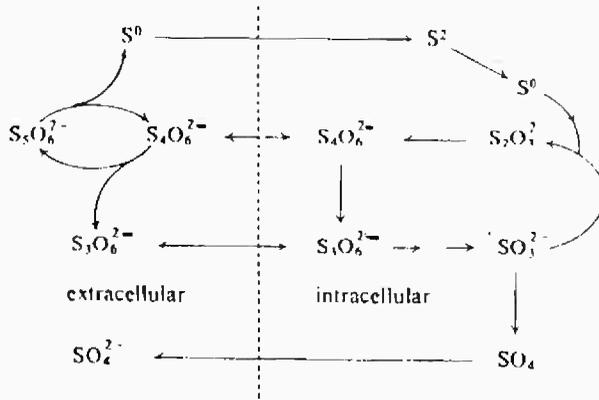


(٤) أكسدة الثيوسلفات إلى التتراثيونات والكبريتات ويصاحبه ارتفاع ملحوظ فى pH ويقوم به بعض mixotrophs :



واما بالنسبة للعقبه الثانية (مشكلة النفاذية) فقد اتضح من الدراسات التى أجريت فى وجود ميكروب *Thiobacillus sp.* ان الثيوسلفات تلعب دور المفتاح key فى تحولات الكبريت وان اختزال S^0 المعدنى إلى S^{2-} يحتاج لوجود الجلوتاثيون glytathione المختزل مظهراً إمكانية وجود permeability barrier ووظيفته غير انزيمية وهى تشبه لما حدث فى أكسدة الحديد بواسطة *Ferrobacillus sp.* التى تحتاج إلى السلفات لانتقال الالكترون إلى داخل الخلية.

وعموماً يمكن وضع تصور عام لطريقة انتقال مركبات الكبريت فى *Thiobacilli* كما يلى :

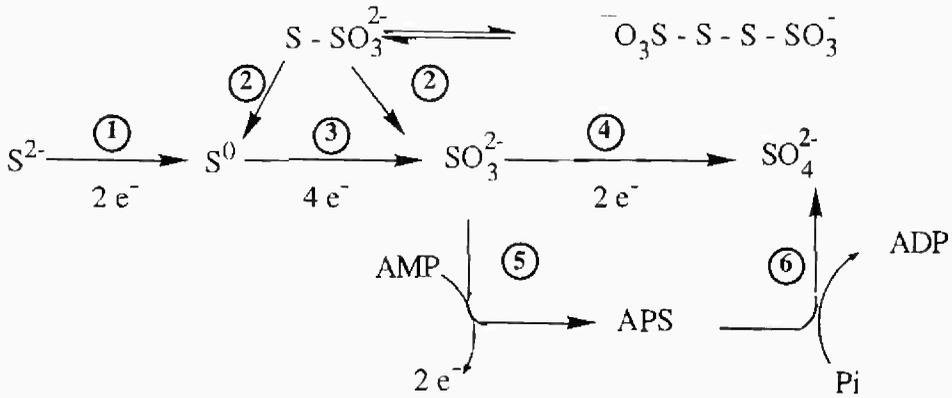


شكل (٦-٨) : انتقال وأكسدة مركبات الكبريت بواسطة *Thiobacilli*

ومنه نتبين أن S^{2-} فقط تستطيع دخول الخلية بينما بقية التفاعلات تحدث على سطح الخلية وتحتاج للحامل .

ومما يؤيد نظرية permeability barrier أنه وجد أن SO_3^{2-} يشبط أكسدة الثيوسلفات فى مستخلص الخلايا .

دورة اكسدة مركبات الكبريت وكيفية الحصول على الطاقة :



شكل (٦-٩) : ميكانيكية اكسدة مركبات الكبريت وتكوين الطاقة

وأهم الانزيمات المشاركة فى هذه التفاعلات هى :

(١) Sulfide Oxidase ويحتاج لوجود الجلوتاثيون الذى يؤكسد السلفيد إلى الكبريت المعدنى .

(٢) rhodanese reductase (EC 2.8.1.1) الذى يشق Cleavage الثيوسلفات $S_2O_3^{2-}$ إلى $SO_3^{2-} + S^0$.

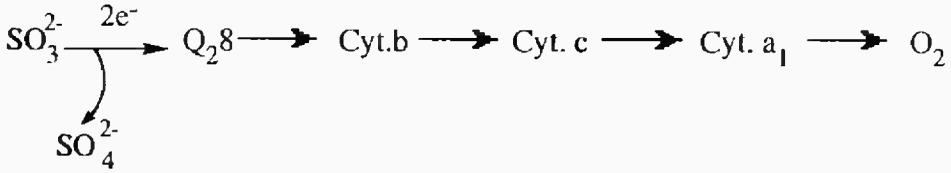
(٣) Sulpher oxidase (EC 1.13.11.18) الذى يؤكسد الكبريت المعدنى إلى ثيوسلفات وهو عبارة عن oxygenase محتوى على الحديد .

(٤) Sulphite oxidase (EC 1.8.3.1) الذى يؤكسد السلفيت إلى السلفات .

(٥) APS - reductase (adenylyl sulfate reductase) (EC 1.8.99.2) ويلاص تكوين ادينوسين فوسفوسلفات .

(٦) Sulfate adenylyl transferase (EC 2.7.7.5) أو يطلق عليه ADP-Sulphurylase وهو يلاص تكوين السلفات ، ADP .

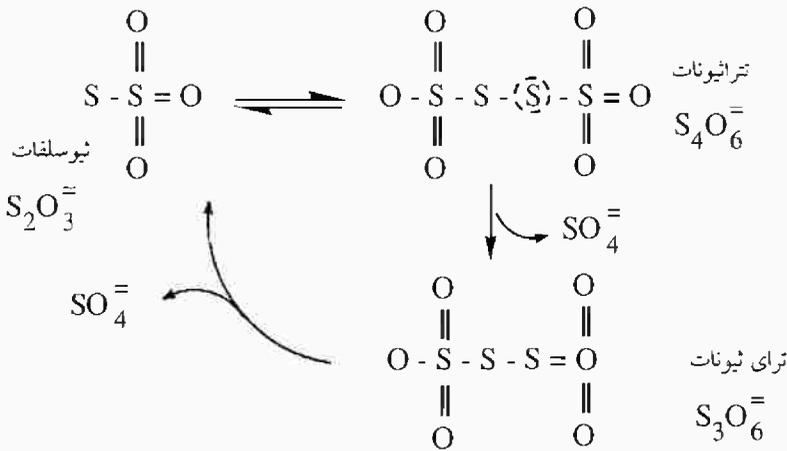
ويبدو أن الالكترونات الناتجة من أكسدة السلفيت مباشرة إلى السلفات (تفاعل ٤) تدخل السلسلة التنفسية قبل مستوى Cyt. C كما بالرسم التالى .



وتتلازم خطوة الأكسدة المباشرة هذه مع عملية فسفرة مؤكسدة حيث تدخل الإلكترونات عند مستوى الفلافين أو الكينون كما سيلي شرحه . (ص ٢٦٢)

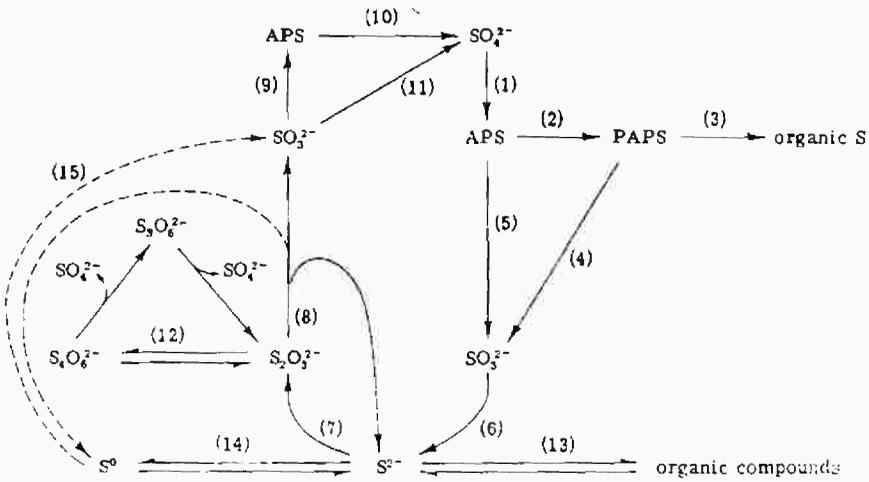
وبعض Thiobacilli مثل *T. denitrificans* ، *T. thioparans* يمكنها استخدام الطاقة الناتجة من أكسدة السلفيت إلى السلفات بطريقة الفسفرة عند مستوى مادة التفاعيل Substrate level phosphorylation (تفاعل ٥ ، ٦) بتأثير انزيم ATP : AMP phosphotransferase (EC 2.7.4.3) أو ما يعرف بـ adenylate kinase . ويتكون امول ATP لكل امول سلفات ناتج

- وهناك طريقة أخرى لأكسدة الثيوسلفات حيث يرتبط ٢ مول ثيوسلفات لتكوين التتراثيونات tetrathionate والتي تتأكسد بالتالى إلى trithionate ثم فى النهاية إلى thiosulfate منتج ٢ مول سلفات أثناء الدورة الحلقية كما بالرسم التالى :



شكل (٦-١٠) الدورة الحلقية لأكسدة الثيوسلفات

والتتراييونات لا تعمل كمادة تفاعل Substrate لتكوين ATP إلا في وجود الجلوتاثيون حيث تتأكسد سريعاً بطريقة غير انزيمية إلى الثيوسلفات . وأكسدة التتراييونات تثبط عند ١٠ ٪ أكسجين بينما تنشط تحولاتها تحت الظروف اللاهوائية . فإذا ربطنا بين كل تفاعلات دورة الكبريت في الطبيعة متضمناً dissimilatory redcuton في (*Desulfovibrio*) ، assimilatory reduction ، (النبات ، الثدييات) ، (Thiobacilli) Sulfer oxidation ، فإن الدورة تبدو كما بالرسم التالي :



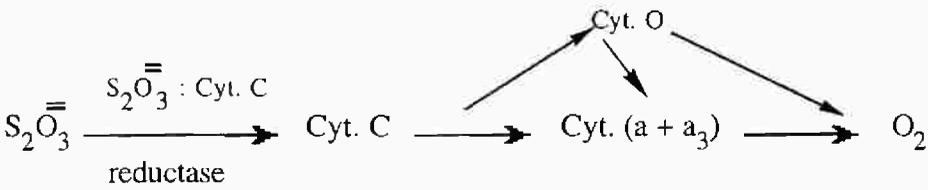
شكل (٦-١١) : تفاعلات أكسدة واختزال المركبات الكبريتية في الطبيعة

نقلاً عن Doelle سنة ١٩٧٥

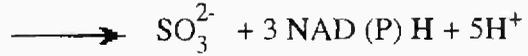
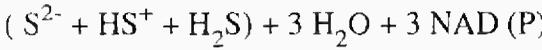
ومن الرسم : فإن تفاعلات (١) ، (٥) ، (٦) تستعمل بواسطة ميكروبات اختزال الكبريت الهدمي dissimilatory ، تفاعلات (٢) ، (٣) ، (٤) تستعمل بواسطة مختزلات الكبريت النباتي assimilatory ، التفاعلات من (٧) إلى (١٢) وكذا (٤) بواسطة Thiobacilli وتفاعل (١٣) بواسطة أغلب الميكروبات . ولقد ذكرت الانزيمات التي تلامس هذه التفاعلات بأرقامها الكودية كل في موضعه سابقاً .

● عملية تمثيل ك أم اوتوتروفيا بواسطة Thiobacilli تحتاج لبقوة مختزلة (NAD (P) H₂) بالإضافة إلى ATP . حيث يرتبط نظام أكسدة الثيوسلفات (انتقال الثيوسلفات عبر الغشاء الخلوى وما يتبعه من أكسدة) مع انتقال الالكترونات . وانزيم تنشيط الثيوسلفات يسمى Cyt. C reductase : S₂O₃²⁻ وهو لا يدخل فى عملية الفسفرة المؤكسدة .

وكما يتضح فإن انتقال الالكترونات إلى جزئى الاكسجين يمر خلال سيتوكرومات ، c ، o ، a₃ ، a ، وهذا يقابله تكوين ATP وتصل p/O ratio إلى 1.0 .



والاختزال المباشر لـ NAD (P) بواسطة مركبات الكبريت المعدنية يستحيل حدوثه من الناحية الثرموديناميكية لأنه يتضمن تفاعل ماص للطاقة .

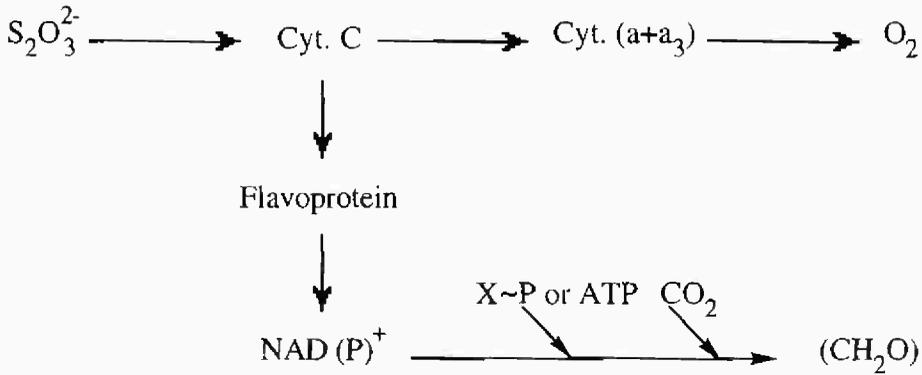


$$\Delta F = + 186 \text{ Kcal/mole}$$



$$\Delta F = + 3.7 \text{ Kcal/mole}$$

لذا طريقة تكوين القوة الاختزالية اللازمة لتثبيت ك أم يتم بواسطة انسياب الكترونى عكسى Reverse ATP- driven election transport حيث تتجه الالكترونات من Cyt. C إلى الفلافوبروتين بدلا من الاكسجين كما هو بالرسم التالى :

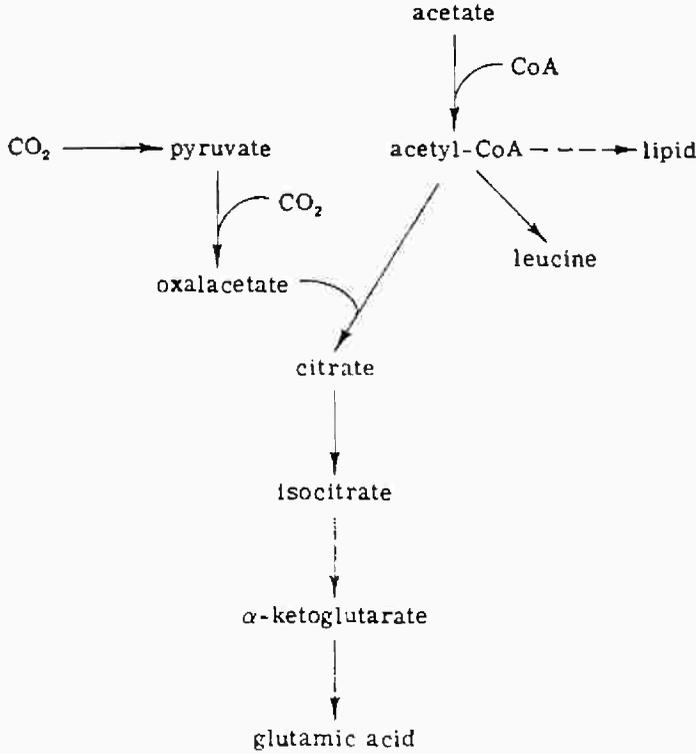


شكل (٦-١٢) : نظام انتقال الالكترونات فى Thiobacilli

ودخول الالكترونات يتم عند مستوى الفلافين مما يقصر طول سلسلة انسياب الالكترون العكسى ولذا فالطاقة الناتجة من الميكروبات الاتوتروفية عموماً قليل .

● بعض أنواع Thiobacilli يستطيع استخدام المواد العضوية مثل حمض الاسبارتيك ، مستخلص الخميرة ، جلوتامات ، استيات . . . إلخ ، ولكن لا يوجد نمو فى غياب الثيوسلفات . وفى كل الأحوال يثبط تخليق انزيم الريبلوز بيوفوسفات كبروكسيليز الخاص بدورة كالفن وتثبيت ك أ_٣ اوتوتروفياً فى وجود هذه المواد العضوية . وتمثل هذه المركبات العضوية يعطى الدليل على وجود انزيمات دورة TCA فى *T. thoparus* .

أما ميكروب *T. neapolitanus* الاتوتروفى الحتمى فيستطيع تنشيط بعض الأحماض الامينية الخارجية لإدخالهم مع ك أ_٣ فى تكوين البروتين أو لتخليق البرولين والارجنين من الجلوتامات وكذا الادينين والجوانين من الجليسين وتشبه ميكانيكية التخليق الحيوى فى هذا الكائن تقريباً الكائنات الهيتروتروفية مع الاحتياج للطاقة الاتوتروفية . وأشهر مثال على ذلك تنشيط الأستات إلى اسيتيل كوانزيم A واستخدامها كمصدر رئيسى لتخليق الليبيدات والأحماض الامينية ثم تكثيف acetyl CoA مع الاكسالواستيات (المتكونة من تثبيت ك أ_٣) لتكوين السترات كما بالرسم التالى :

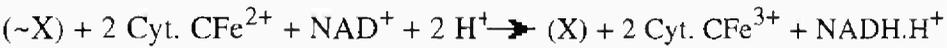
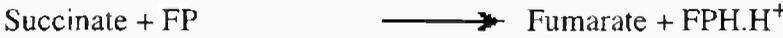


شكل (٦-١٣) : تحولات الاسيتات بواسطة الانوتروفي الختمي *T. neapolitanus*

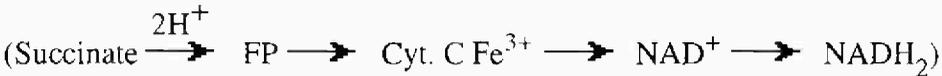
- وبعض أفراد *thiobacilli* الى *mixotroph* مثل *T. novellus* يستطيع النمو تحت ظروف هتيرتروفية كاملة ولا تحتاج إلى الطاقة الانوتروفية . ويبدو وجود تغيرات جوهريه في بناء الغشاء السبتيلازمي وكذا امتلاك الميكروب لكل انزيمات دورة TCA ودورة glyoxylate . كما يمتلك انزيم *glutamate dehydrogenase* المرتبط بالمرافقات الانزيمية NAD^+ ، $NADP^+$ والذي يلعب دوراً تنظيمياً في تخليق الجلوتامات بالذات حيث ينظم AMP (الذي يتكون أثناء عمليات التخليق الحيوي) التوازن بين بناء وهدم الجلوتامات . ويستطيع ميكروب *T. novellus* استعادة قدرته على النمو الانوتروفي بمجرد توافر ك أم وبعض الأحماض العضوية في البيئة مع الثيوسلفات .
- وعملية تنظيم النمو الانوتروفي والهيتروتروفي تتم عند مستوى *glucose 6-P* *dehydrogenase* ، *isocitrate DH* ، *keto glutarate DH* المرتبطة بـ $NAD(P)$ حيث تحت الظروف الانوتروفية يكون أكسدة الثيوسلفات في أقصى معدلاتها بينما يقل نشاط انزيمات هدم الجلوكوز بينما تحت الظروف الى *mixotroph* يقلل

وجود المواد العضوية من الطاقة اللازمة للنمو ويثبط نظام أكسدة الثيوسلفات وتحفز انزيمات هدم الجلوكوز . وفى الظروف الهيتروتروفية وغياب الثيوسلفات فإن دورتى ED ، TCA تصبجان فى أقصى معدلاتهما . والتحكم فى انزيم G-6P DH (بواسطة ATP الذى يثبط هذا الانزيم) هو الذى يحدد الدورة المستخدمة وتشبه فى ذلك بكتريا الايدروچين .

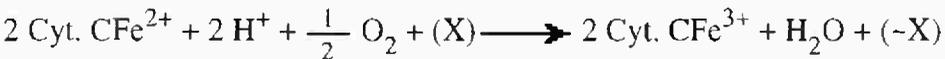
● ونظام تكوين الطاقة فى thiobacilli الهيتروتروفية غير واضح للآن ويبدو أنها تمتلك نظام الانسياب الالكترونى العكسى . وفى هذه الحالة فإن أكسدة الأحماض العضوية تنتج مكونات وسطية بالخلية عالية الطاقة مثل ATP أو مشتقاتها (~X) التى تعكس الانسياب الالكترونى العادى فى السلسلة التنفسية بحيث تختزل NAD^+ بواسطة Cyt. C كما فى بقية الاتوتروفيات .



ويمكن تلخيص المعادلات السابقة فى الصورة التالية :



أو أن يتأكسد Cyt. C مباشرة بواسطة جزئى الاكسجين مع إنتاج مركب غنى الطاقة (~X) .



وهذا المركب الغنى بالطاقة يتكون عند مستوى السيتوكروم اكسيداز الطرفى ويمكن استخدامه فى انتقال الالكترون العكسى لاختزال NAD (P)^+ .

٦٠٦ الفرق بين الميكروبات الاتوتروفية والميتروتروفية

سبق تعريف الميكروبات الاتوتروفية بأنها التى تستطيع الحصول على طاقتها اما من الضوء (الفوتوتروفية) أو أكسدة المواد الغير عضوية (Clemolithotroph) واستخدام ك μ كمصدر كربون وحيد وتمثيله إلى مادة الخلية من خلال دورة كالفن (الريبولوز بيوفوسفات) ولكن وجد أن عدد ليس بالقليل من ميكروبات المجموعة السابقة يستطيع النمو تحت الظروف الهيتروتروفية فيما يسمى *border line cases* . وثبت أن التركيب الخلوى متشابه فى الاتوتروفية والهيتروتروفية وان كليهما يملكان نفس الانزيمات ويحتاجان نفس الفيتامينات والمرافقات الانزيمية بل يملكان نظام الفسفرة لتكوين ATP مع تميز الاتوتروفية بامتلاكها بعض الانزيمات الإضافية لتمكينها من أكسدة الأملاح الغير عضوية واختزال ك μ لتخليق مادة الخلية .

فلماذا لا توضع الميكروبات الاتوتروفية مع الهيتروتروفية خاصة أن بعضها يستطيع تمثيل الجلوكوز ولكن ليس كمصدر للطاقة ؟

حاول Kelly سنة ١٩٦٧ وضع تعريف يتضمن ٦ نقاط (منفردة أو مجتمعة) للميكروبات الاتوتروفية .

(١) نفاذيتها المحدودة للمواد العضوية .

(٢) عدم مقدرتها على أكسدة المواد العضوية للحصول على الطاقة أى حتى فى حالة نفاذية بعض المواد العضوية خلال الغشاء فإن الميكروب لا يستطيع الحصول على طاقة من أكسدتها .

(٣) عدم مقدرتها على تخليق مادة الخلية العضوية من أى مصدر كربونى خلاف ك μ الذى يُمثل من خلال دورة كالفن . وقد عدل هذا البند أخيراً بقدرة الميكروب على امتلاك انزيم ريبولوز ٥١ بيوفوسفات كربوكسيليز (مفتاح دورة كالفن) .

(٤) يُبْطَأ أو يُوقَف نموها فى وجود مواد عضوية خارجية مثل إضافة الجلوكوز - الاسيتات . . . إلخ .

(٥) التثبيط الذاتى من نواتج التحولات الايضية العضوية التركيب *feed back inhibition* مثل حمض البيروفيك يثبط ميكروبات Thiobacilli بقوة .

(٦) الاعتماد على طاقة الضوء (الفوتوتروفية) وأكسدة المواد الغير عضوية (الكيموتروفية) ووجود الأجهزة الخاصة بذلك .

ورغم ذلك فلا بد من مزيد من الدراسات على الميكانيكيات المنظمة لعملية تثبيت ك_٢ .
ولتجاوز هذه المشكلة وإيجاد Terminology محدد قام Peck سنة ١٩٦٨ بتقسيم
الميكروبات الكيموتروفية إلى ٣ مجاميع :

(١) obligate autotroph وهى التى تحصل على طاقتها فقط من أكسدة المواد الغير عضوية
ولا تستطيع تمثيل المواد العضوية البسيطة مثل الاستيات بنفس طريقة ك_٢ ومثالها
Nitrosomonas europaeae ، *Thiobacillus thiooxidans* .

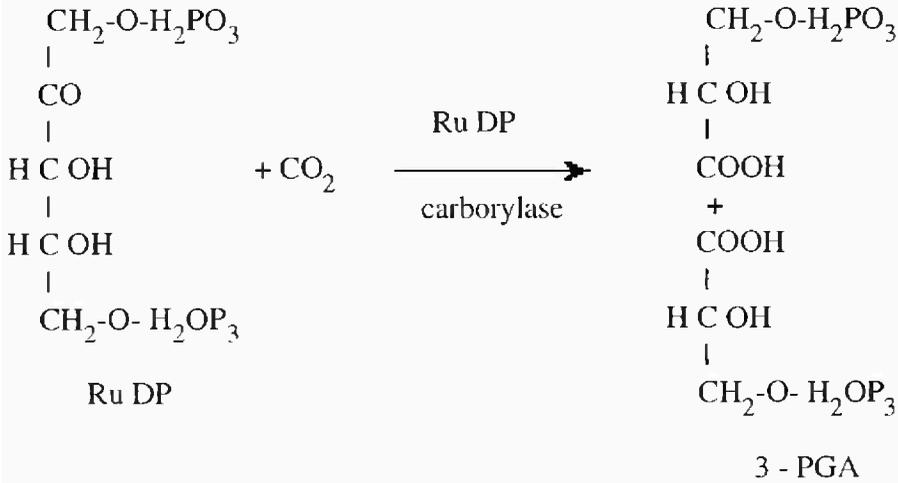
(ب) Facultative autotroph وهى القادرة على استخدام كل من المواد العضوية
والغير عضوية كمصدر للطاقة والنمو ومثالها *Nitrobacter sp.* ،
Hydrogenomonas sp. ، *Thiobacillus intermedius* .

(ج) Assimilatory autotroph التى تحصل على طاقتها فقط من أكسدة المواد الغير
عضوية ولكنها تستطيع إدخال المواد العضوية خلال الغشاء الخلوى وتستخدمها فى
التخليق الحيوى لمكوناتها ومثالها *Dosulfovibrio* .

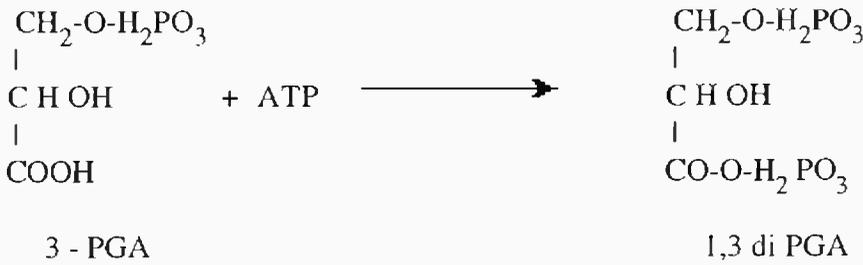
وأخيراً قام Ritteaberg سنة ١٩٦٩ بتغيير أسماء المجاميع الثلاثة السابقة إلى
Chemolithotrophic heterotroph ، mixotroph ، obligate Chemolithotroph
على الترتيب .

أما بالنسبة للميكروبات الفوتوتروفية فقد سبق مناقشة الفروق بين أفرادها فى الباب
الثالث من هذا الكتاب .

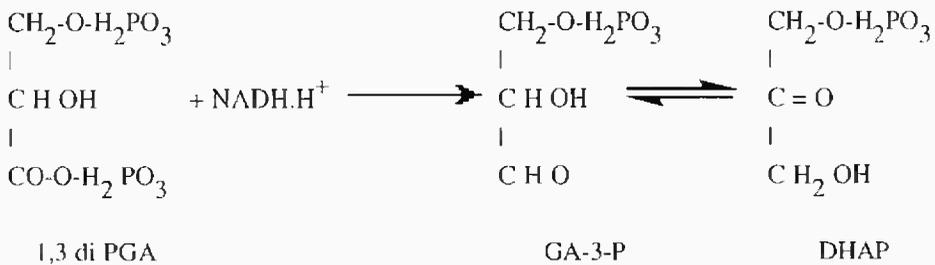
وعموماً فإن مشكلة النمو الاتوتروفى أو الهيتيرتروفى فى كلا الميكروبات الفوتوتروفية أو
الكيموتروفية تكاد تكون متطابقة .



(٢) يتحول ٣ - فوسفو جليسيرات إلى ٣ر١ دى فوسفو جليسيرات (1.3 di PGA) فى وجود انزيم فوسفو جليسيرات كينيز (EC 2.7.2.3) وهى خطوة فسفرة تحتاج لطاقة .

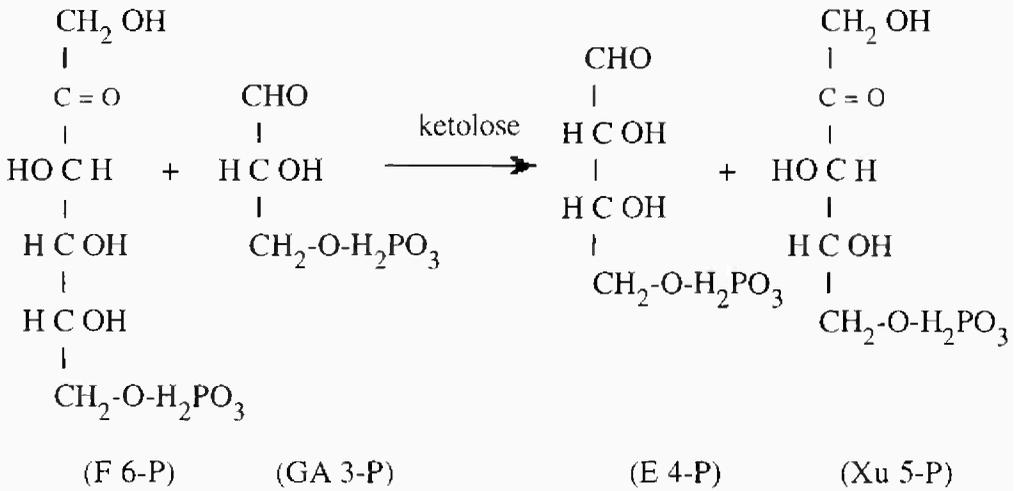


(٣) أكسدة مففرة ثانية فى وجود انزيم NADP-linked dehydrogenase (EC 1.2.1.13) لتكوين جليسرلدهيد ٣ - فوسفات (GA-3-P) . والمركب الأخير يوجد فى حالة تساوزن مع دى هيدروكس اسيتون فوسفات (DHAP) بمساعدة انزيم triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) .



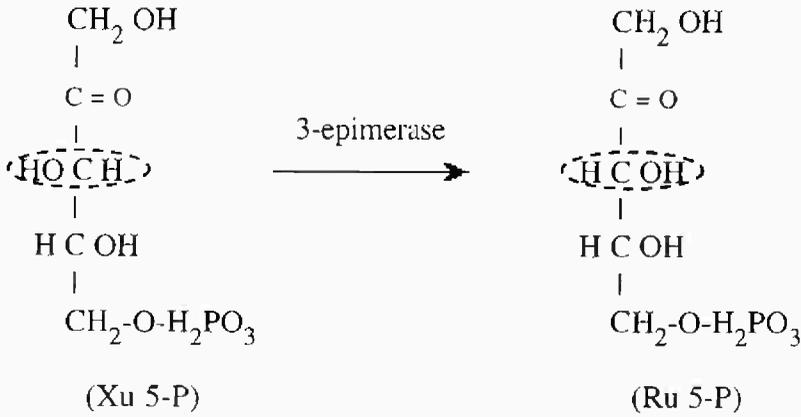
والفركتوز ٦ - فوسفات يمكن أن يتحول فى طريقين مختلفين أما إنتاج سكروز أو بنتوزات (كما فى حالة الميكروبات الاتوتروفية) التى تدخل فى تكوين الأحماض النووية مثل RNA ، DNA أو تدخل فى إعادة غلق الدورة الحلقية بتكوين الريبولوز ١ ، ٥ داي فوسفات .

(٦) يقوم انزيم Transketolase (EC 2.2.1.1) بربط F 6-P مع GA3-P وشقهما (فصلهما) إلى اريثروز ٤ - فوسفات (E 4-P) ، الزيليلوز ٥- فوسفات (Xu-5P) .

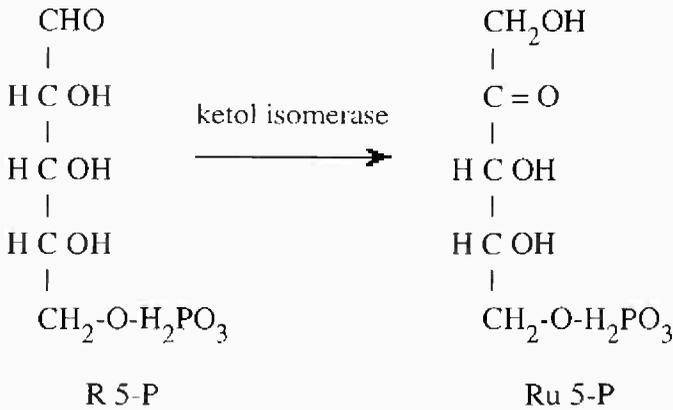


(٧) تستكمل بقية الخطوات مثل دورة HMP حيث فى وجود Transaldolase يرتبط E 4-P مع F 6-P ويحدث تفاعل انشقاقي Cleavage reaction ينتج عنه سيدو هيبنتوز ٧ - فوسفات (S 7-P) ، الجليسرلدهيد ٣ - فوسفات (GA 3-P) والذى يتبعه تفاعل انشقاقي ثان يلامسه Transketolase يتكون عنه ريبوز ٥ - فوسفات (R-5-P) ، الريبيلوز ٥ - فوسفات (Xu-5-P) .

(٨) يتحول الزيليلوز ٥ - فوسفات إلى الريبولوز ٥ - فوسفات (Ru 5-P) فى وجود Ru 5-p 3-epimerase (EC 5.1.3.1) .



بينما يتحول الريبوز ٥- فوسفات (R 5-P) إلى ريبولوز ٥- فوسفات (Ru 5-P) في وجود انزيم R-5-P ketol isomerase (EC 5.3.1.6) .



(٩) الانزيم الثاني الذى يميز دورة كالفين ويغلق الدورة الحلقية هو phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19) وهو يفسفر الريبولوز ٥- فوسفات إلى ريبولوز ١,٥ دى فوسفات (Ru DP) الذى هو مفتاح الدورة والذى سميت باسمه .

ففى هذا الميكروب ثبت أن حمض الاسبارتيك من النواتج الثابتة لعملية تثبيت ك أم وان ذلك يرجع إلى خطوة إضافة ك أم ثانية عند مستوى فوسفو اينول بيروفات يلامسها انزيم PEP Carboxylase (EC 4.1.1.31) وينتج عنها اوكسالواستيات . وبواسطة عملية نقل مجموعة الامين Transamination يتكون الاسبارت . ولهذا افترض أن *Chromatium* يستعمل دوره «تثبيت ك أم مضاعفة» كوسيلة سريعة لإدخال الكربون فى الأحماض العضوية ثم الامينية لتخليق مادة الخلية .

أسئلة للمراجعة

- ١ - اذكر ٥ مجاميع مختلفة للميكروبات Chemolithotrophs التى تقوم بعملية التنفس الهوائى .
- ٢ - «يتضمن أكسدة الامونيا إلى النيتريت انتقال ٦ (سته) الكترونات» ناقش هذه العبارة موضحاً المركبات الوسيطة وتعاقب سلسلة التفاعل .
- ٣ - «خطوة أكسدة الهيدروكسيل منتجه للطاقة exergonic مما يدل على ارتباطها بنظام السلسلة التنفسية» وضع ذلك .
- ٤ - اشرح كيف تستطيع بكتريا التآزت (أو الكيموتروفية عموماً) الحصول على طاقتها (ATP) ، تكوين القوة المختزلة ($NADH.H^+$) اللازمة لتثبيت ك أم برغم أن جهد الاكسدة والاختزال لمواد تفاعلها أقل بكثير من جهد $NAD^+ / NADH_2$ ؟
- ٥ - اذكر أهم الفروق بين النظام الانزيمى لكل من *Nitrobacter* ، *Netrosomonas* ؟
- ٦ - «تستطيع بكتريا *Hydrogenomonas* النمو اوتوتروفيا وهتيرتروفيا» ناقش هذه العبارة موضحاً الانزيم المسئول (Key) للنمو الاتوتروفى ، الظروف اللازم توافرها لتكوين بولى هيدروكسى بيوترات ، تأثير الايدروجين H_2 -effect ؟
- ٧ - اشرح الفارق بين ميكروبي أكسدة الحديد .
Ferrobacilles ferrooxidans & Thiobacillus ferrooxidans
- ٨ - اشرح السلسلة التنفسية لميكروبات Thiobacilli .
- ٩ - اشرح المصطلحات التالية :
Obligate Facultative , assimilatory autotrophs
وكذا
Chemolithotrophic heterotroph, Mixotroph
- ١٠ - اشرح سلسلة انتقال الالكترون لميكروب mixotroph يستطيع أكسدة المركبات الغير عضوية مثل السلفيت ، أو المركبات العضوية مثل الجلوكوز تحت الظروف الهوائية ؟
- ١١ - ما هو الفرق بين Sulfate oxidation ، assimilatory Sulfate reduction ،
dissimilatory Sulfate reduction ؟
- ١٢ - اشرح لماذا وضعت الخمس مجاميع بكتيرية السابقة تحت مسمى aerobic chemo- lithotraphs ومدى انطباق شروط Kelly عليها .
- ١٣ - ماذا يعنى « دورة تثبيت ك أم المضاعفة » ؟ وأين تلاحظ وما أهميتها ؟

المراجع

1. Aleem, M.I.H. and Lee, H. (1963). ATP-dependent reduction of NAD by ferrocyclochrome C in chemolithotrophic bacteria. Nature (London) 200 : 759.
2. Aleem, M.I.H. (1965). Thiosulfate oxidation and electron transport in *Thiobacillus novellus*. J. Bacteriol. 90 : 95.
3. Anderson, K.J. and Lundgren, D.G. (1969). Enzymatic studies of the iron-oxidizing bacterium. Can. J. Microbiol. 15 : 73.
4. Blackkolb, F. and Schlegel, H.G. (1968). Regulation der Glukose-6-phosphate DH aus *Hydrogenomonas* H16 durch ATP und NADH₂. Arch. Mikrobiol. 63 : 177.
5. Delwiche, C.C. (1981). Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. John Wiley & Sons Inc., New York.
6. Doelle, H.W. (1975). Bacterial metabolism 2nd Ed. Academic Press, New York.
7. Gundersen, K. (1968). The formation and utilization of reducing power in aerobic chemolithotrophic bacteria. Z. Allg. Mikrobiol. 8 : 445.
8. Hurlbert, R.E. and Lascelles, J. (1964). Ribulose diphosphate carboxylase in Thiorhodaceae. J. Gen. Microbiol. 33 : 445.
9. Kelly, D.P. (1967) Problems of autotrophic microorganisms. Sci. Progr. (London), 55 : 35.
10. Lecs, H. (1954). The biochemistry of nitrifying bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 4 : 84.
11. Peck, H.D., Jr. (1968). Energy-coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 22 : 489.

12. Ramsay, H.H. (1968). Autotrophic and Heterotrophic metabolism in *Hydrogenomonas facilis*. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 34 : 71.
13. Rittenberg, S.C. (1969). The role of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. Advan. Microbiol. Physiol. 3 : 159.
14. Rose, A.H. (1965). Chemical Microbiology. Butterworth, London.
15. Schlegel, H.G. (1966). Physiology and biochemistry of Knallgas bacteria. Advan. Comp. Physiol. Biochem. 2 : 185.
16. Schön, G. (1965). Untersuchungen über der Nutzeffekt von *Nitrobacter winogradskyi* Buch. Arch. Mikrobiol. 50 : 111.
17. Tabita, R. and lundgren, D.G. (1971). Heterotrophic metabolism of the chemolithetrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 108 : 334.
18. Trudinger, P.A. (1967). The metabolism of inorganic sulfur compounds by Thiobacilli. Rev. Pure Appl. Chem. 17 : 1.
19. Umbreit, W.W. (1962). Comparative physiology of autotrophic bacteria. Bacteriol. Rev. 26 : 145.
20. Yoshida, T. and Alexander, M. (1964). Hydroxylamine formation by *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. 75 : 1265.