الباب الرابع
التنفس اللاهوائى

Anaerobic Respiration

obeikandl.com

obeikandl.com

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 أيدروچين القوة الاختزالية $NAD\ (P)H_2$ من مادة التفاعل وهو مصدر (معطى) خارجى.

«ولكن أغلب الميكروبات تحصل على طاقتها من التفاعلات الكيمياوية 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 الكيمياوية 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 البيولوچية عموماً :

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

obeikandl.com

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

أ) Sulfate reducing bacteria وتستخدم $SO_4^{=}$.

ب) Denitrifying bacteria وتستخدم NO_3 .

جـ) Methanobacterium وتستخدم CO_2 .

د) Fe^{3+} reducing bacteria وتستخدم Fe^{3+} .

obeikandl.com

١٠٤ البكتريا المختزلة للكبريتات أو Sulfate respiration

- عدد الميكروبات التى تستخدم الكبريتات كمستقبل نهائى للالكترون صغير ويطلق عليها Desulforicants ويمكن تقسيمها كالتالى :

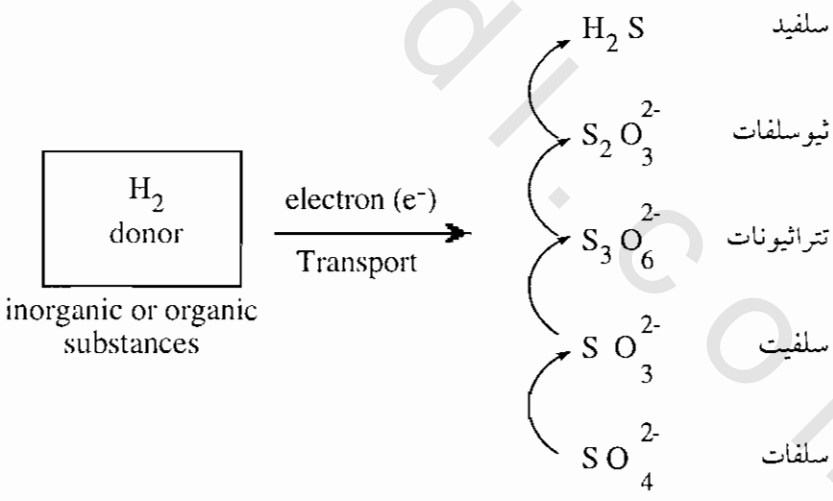
١ - لا تكون جراثيم وتشمل :

- *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 للالكترون (أيدروجين - ثيوسلفات - بيوسلفات - مستخلص خميرة - أيدروجين عضوى - ك أ٢) .



- إضافة مستخلص الخميرة يحفز النمو ويحتاج الاسيتات ، ك أ٢ لتخليق مادة الخلية ولهذا تصنف هذه البكتريا المختزلة للكبريتات كـ 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 ٪

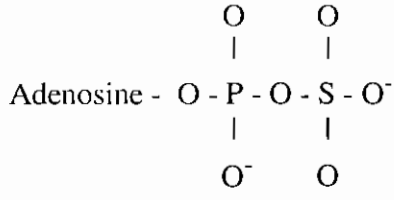
أما *Desulfotomaculum* يحتوى على ٤٢-٤٦ ٪ G + C

١٠١٠٤ اختزال الكبريتات باستخدام الايدروجين كمعطى للالكترون

تستطيع بكتريا *D. desulforicans* اختزال الكبريتات سريعاً فى وجود الأيدروجين والمعادلة العامة هى :

$$4\,H_2 + SO_4^{=} \longrightarrow S^{=} + 4\,H_2O$$

ودراسات الديناميكا الحرارية على الخلايا أو مستخلاصاتها تؤكد أن الاختزال يتم فى عدة خطوات مستخدماً الكبريت العضوى Adenosine 5-phosphosulfate (APS) كمركب وسطى 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 التى تستمد من ATP :

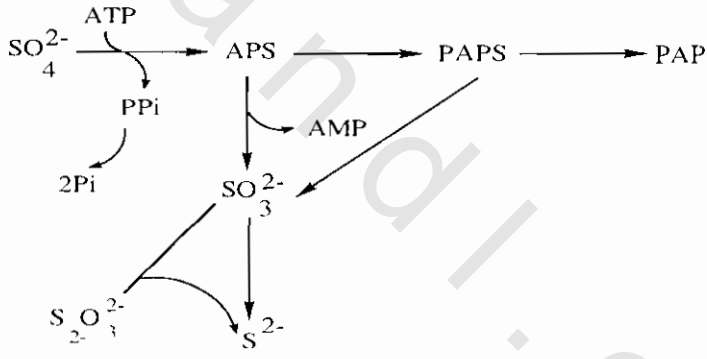
(1) $ATP + SO_4^{2-} \rightleftharpoons APS + PPi$

$PPi \rightarrow 2\,Pi$

وتعتبر هذه هى الخطوة الأولى فى اختزال الكبريتات والتى تؤدى إلى غرضين :

١ - تخليق مركب غنى بالطاقة (APS) .

٢ - انفصال PPi من ATP مما يؤدى لتحليل رابطتين فوسفاتيتين غنيتين بالطاقة حيث يتحول PPi سريعاً إلى فوسفات معدنى Pi والإنزيم الذى يلامس هذه الخطوة هو: sulfate adenylyl - transferase (EC 2. 7. 7. 4)



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

- أما الخطوة الثانية فى اختزال الكبريتات فتتضمن أكسدة جزئ الأيدروجين بواسطة أنزيم hydrogenase قوى جداً يحتاج Fe فى أغلب السلالات مما أدى لاكتشاف سيتوكروم C_3 وهذا السيتوكروم ذائب ، ذاتى الأكسدة autooxidizable ، يقاس عند 419nm ، 523nm ، ذو جهد أكسدة واختزال منخفض 250 mV - ، ونقطة التعادل الكهربى (IEP) iso electric point عند pH أقل من ١٠ ، يحتوى على ٩ر ٪ حديد ويعمل كحامل

للالكترون في التفاعلات التى يكون الأكسجين فيها هو المستقبل النهائى (يمكن اختزال أى آثار للأكسجين فى البيئة) .

$$Fe_2^{4+} + 2\ H^+ = Fe^{6+} + H_2 \qquad \Delta F = -\ 9500\ Cal\ /\ mole$$

وسيتوكروم C_3 مسئول عن جهد الأكسدة والاختزال المنخفض المطلوب لنمو Desulforcants حيث تحتاج هذه الكائنات إلى جهد اختزال لا يزيد عن 200 mV - وتوضح المعادلة التالية الخطوة الثانية والتى يعمل فيها Cyt. C_3 كحامل للالكترون .

$$(2)\quad APS + Cyt\ C_{3\ (red)} \longrightarrow SO_3^{2-} + AMP + Cyt.\ C_{3\ (oxid)}$$

والانزيم الذى يلامس التفاعل هو adenylylsulfate reductase (EC 1-2-99.2) وبقية الخطوة الثانية هى اختزال Cyt. C_3 المؤكسد بملامسة أنزيم hydrogenase وأكسدة الأيدروچين .

$$(3)\ H_2 + Cyt.\ C_{3(oxid)} \longrightarrow Cyt.C_{3(red)} + 2\ H^+$$

- والخطوة الأخيرة هى اختزال السلفيت Sulfite إلى السلفيد Sulfide بملامسة أنزيم Sulfite reductase (EC1.8.99.1) كما يلى :

$$(4)\ SO_3^{2-} + 6H^+ \longrightarrow S^{2-} + 3H_2O$$

وتمثل المعادلات الأربع عملية اختزال الكبريتات إلى الكبريتيد فى وجود H_2 كمعطى للأيدروچين والتى تحتاج مصدر طاقة ATP ($2P/SO_4^{2-}$) لتنشيط السلفات وهذا لا يتأتى من مادة التفاعل أو السلفات أو الأيدروچين والمصدر البديل الوحيد هو الفسفرة المؤكسدة oxidative phosphorylation المقابلة Coupled لأكسدة الأيدروچين .

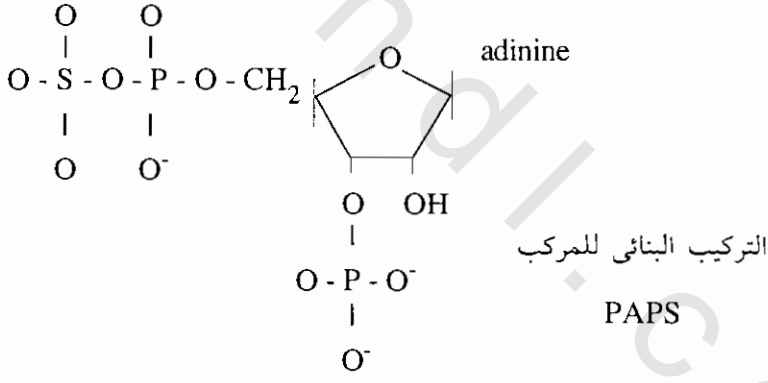
obeikandl.com

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

ولقد توصلت الأبحاث الحديثة باستخدام داى 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 النظير 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)

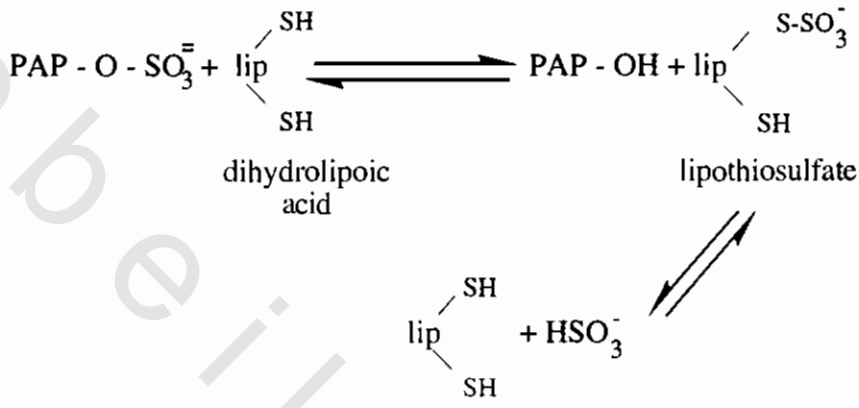


التركيب البنائى للمركب PAPS

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

$$NAD\ PH.H^+ + PAPS \longrightarrow NADP^+ + PAP + HSO_3^-$$

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

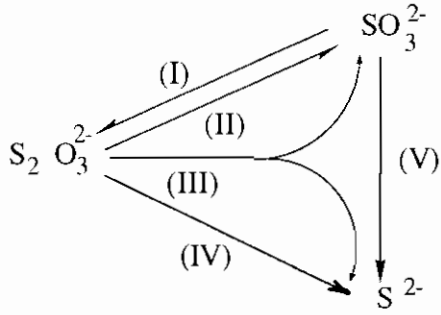


ووجود هاتين الطريقتين (PAPS , APS) لاختزال السلفات يفَّرق بوضوح بين الكائنات التى تستعمل اختزال الكبريتات dissimilatory (هدم) عن الكائنات التى تستعملها assimilatory (بناء) حيث الاختزال الهدمى يتم بواسطة الكائنات التى فى حاجة كبيرة لاتمام تنفسها اللاهوائى باستخدام السلفات كمستقبل للالكترون (Desulforicants) وكمية السلفيت الناتجة توازى كمية H_2 ، المادة العضوية المهدومة . 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 Assimilato-ry reduction) .

obeikandl.com

٢٠١٠٤ اختزال الثيوسلفات فى وجود الأيدروجين

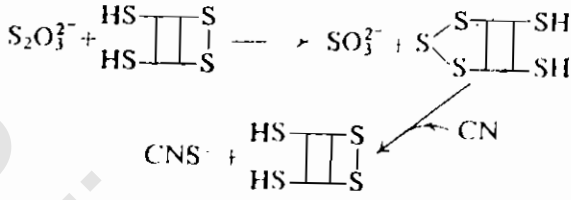
يمكن اختزالها بعدة طرق كما يلى :



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_3 لاختزال الثيوسلفات إلى السلفيد (H_2S) وتكوين السلفيت ($SO_3^{=}$) حيث ذرة الكبريت الخارجية للثيوسلفات تختزل إلى H_2S وذرة الكبريت الداخلية تتراكم كسلفيت والذى يختزل بعد ذلك إلى H_2S 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 جزئ الأيدروجين فى مستخلص الخلايا لميكروب *Desulfovibrio gigas* وهذا النظام مثل thiosulfate reductase السابق ذكره - يحتاج Ferrodoxin ، Flavodoxin كحامل للاكترون - ولكن لم يعرف بعد إذا كان الانزيمان Thiosulfate or bisulfate reductases متشابهان أم لا .
- ميكروب *Thiobacillus denitrificans* اللاهوائى يظهر سلوكاً آخراً فى

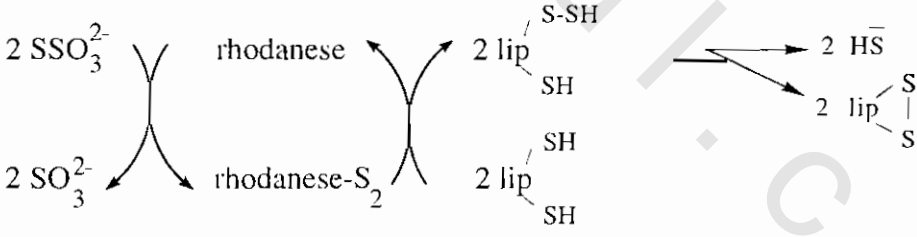
اختزال الثيوسلفات حيث عزل منه انزيم يشبه rhodanese أو thisoulfate sulfertransferase (EC. 2.8 1.1) الذى يحوّل الثيوسلفات إلى السلفيت فى وجود حمض الليبوثيك أو ليبواميد (تفاعل II) فى الرسم السابق والذى يمكن توضيحه تفصيلا فى الرسم اللاحق .



شكل (٤-٣) : يحوّل الثيوسلفات لا هوائياً بواسطة
Thiobacillus denitrificans فى وجود lipoamide

وانزيم rhodanese البكتيرى ينظر إليه كانزيم 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 الكبرت الخارجية فى الثيوسلفات إلى dihydrolipoate عبر انزيم rhodanese مكوناً lipoate persulfide وهو مركب عالى النشاط وينشق مباشرة إلى lipoate-S_2 و HS^- .

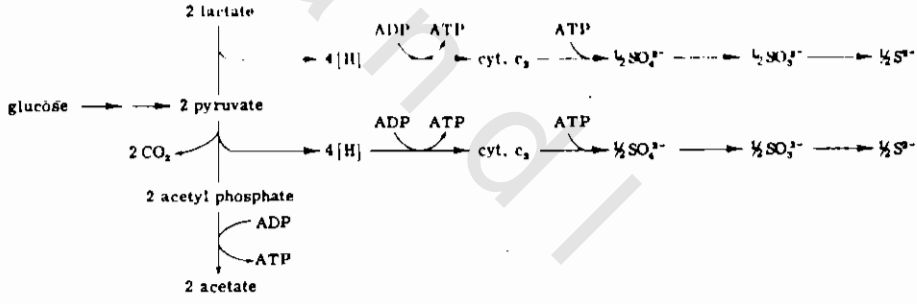
ويشير اكتشاف هذا الانزيم فى *Desulfotomaculum nigrificans* كبروتين منفصل

عن Thiosulfate reductase إلى أن التفاعل المسئول 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 والناتج النهائى هو الاستيات ، CO_2 ، H_2S .

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 Desulforicants يتم نزع ك أ٢ من البيروفات وتتحول إلى اسيتيل الفوسفات ، CO_2 ، H_2 ويحتاج هذا التفاعل إلى الفوسفات المعدنى، Co A وهو يشبه ما يحدث فى تفاعل الفسفرة فى Clostridia كما سيأتى ذكره فى الباب التاسع ويعتقد أيضاً أن Thiamine diphosphate مطلوب أيضاً .

- أما ATP المطلوب لتنشيط السلفات أثناء اختزالها فيأتى من تحول اسيتيل الفوسفات إلى الاسيتات ، ATP . وانزيم acetokinase المشارك فى هذا التفاعل متخصص للاسيتات وغير نشط مع الفورمات أو البروبيونات أو البيوترات أو السكسينات ويمكن شرح التفاعل بالتفصيل كالتالى والذى يعرف بعملية نزع ك أ٢ المفسفرة phosphoroclastic decarboxylation .

$$2\ CH_3\ CHOH\text{-}COOH \longrightarrow 2\ CH_3 . CO . COOH + 4\ H^+$$

$$2\ CH_3\ CO\ COOH + 2\ HOPO_3^{2-} \longrightarrow 2\ CH_3\ COOPO_3 + 2\ CO_2 + 4\ H^+$$

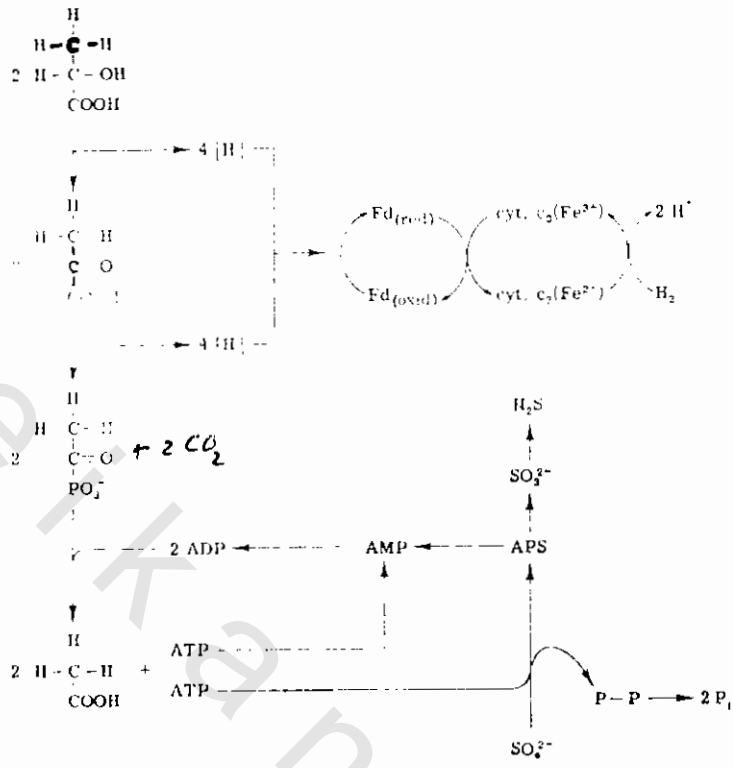
$$2\ CH_3\ COOPO_3 + AMP + 2H^+ \longrightarrow 2\ CH_3\ COOH + ATP$$

$$SO_4^{2-} + ATP + 8H^+ \longrightarrow S^{2-} + 2\ H_2S + AMP + 2HOPO_3^{2-} + 2H^+$$

$$2\ CH_3.CHOH.COOH + SO_4^{2-} \longrightarrow 2\ CH_3 . COOH + 2\ CO_2 + S^{2-} + 2H_2S$$

- الفيرودكسن ضرورى لعملية نزع ك أ٢ المصحوبة بعملية فسفرة وأيضاً ضرورى لتنشيط اختزال الكبريتات .

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



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

- أما سبب التأثير المشجع لـ ATP على تكسير البيروفات فيرجع لتكوين ADP (كما بالرسم) الذى يعجّل بالتخلص من اسيتيل الفوسفات وإكمال بقية خطوات التفاعل .
- المحصلة النهائية لـ ATP المتكون مشابهة لما يحدث فى اختزال الكبريتات بواسطة H_2 كمعطى للأيدروچين . حيث ان ٤ أزواج الالكترونات الناتجة من أكسدة ٢ جزئ اسيتيل فوسفات تستخدم فى تحويل جزئ 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 الالكترون من اللاكتات أو البيروفات إلى السلفات .
- والسؤال الهام هو كيف يستطيع ميكروب *Desulfovibrio* استبدال اختزاله للسلفات

باستخدام تفاعل الفسفرة phosphoroclastic reaction التقليدى كما فى *E. coli* (راجع الباب التاسع) ؟

هذه الميكانيكية التقليدية تنتج فورمات بالإضافة إلى اسيتيل فوسفات ولكن الفورمات لم تعزل بعد كمركب وسطى فى تحولات البيروفات بواسطة هذا الميكروب ويحتمل أن تحول الفورمات يتم - عبر $Cyt.C_3$ - إلى H_2 ، CO_2 الذى يتبادل بعد ذلك مع البيروفات . وقد عزز اكتشاف انزيم الفورمات ديهيدروجيتنز المرتبط على الغشاء الستيوبلازمى فى ميكروب *D. vulgaris* الدليل على وجود تفاعل فسفرة تقليدى مع Formate hydrogenlyase System . وبرغم 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 هى خطوة إنتاج الطاقة الوحيدة المتاحة . فإذا كان *D. desulforicans* تستعمل البيروفات بدون اختزال السلفات فلابد أن هذا الكائن يستعمل ميكانيكية فسفرة مؤكسدة إضافية للحصول على الطاقة اللازمة لنموه والتى تحدث عند مستوى Fumarase . وقد ثبت مثلاً أن ميكروب *D. gigas* يملك بالفعل انزيمات Fumarase ، التى تلامس هدرجه الفيومارات إلى المالات ونزع ك أ المؤكسدة من المالات إلى البيروفات ، ويشير وجود malatc 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 بالأيدروجين بالعديد من المركبات العضوية والأخيرة تنتج ATP كافى لتحفيز اختزال الكبريتات أو تعمل كمعطى للأيدروجين فى 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 phosphoroclastic reaetion من النوع Clostridial Type يعتبر فريداً من نوعه اما فى 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 للالكترون) مستعملاً الايدروجين (كمعطى للالكترون) . والمعادلة العامة كما يلى :

$$5\,H_2 + 2\,NO_3^- \longrightarrow N_2 + 4\,H_2O + 2OH^-$$

والناتج النهائى لاختزال النترات هو النتروجين ولكن هناك نواتج وسطية ذات أثر كبير فى تلوث البيئة مثل أكسيد النيتروز (N_2O) ، أكسيد النيتريك (NO) من ناحية التأثير على طبقة الأزون أو ظاهرة البيوتات الزجاجية (ارتفاع درجة حرارة الكون) .

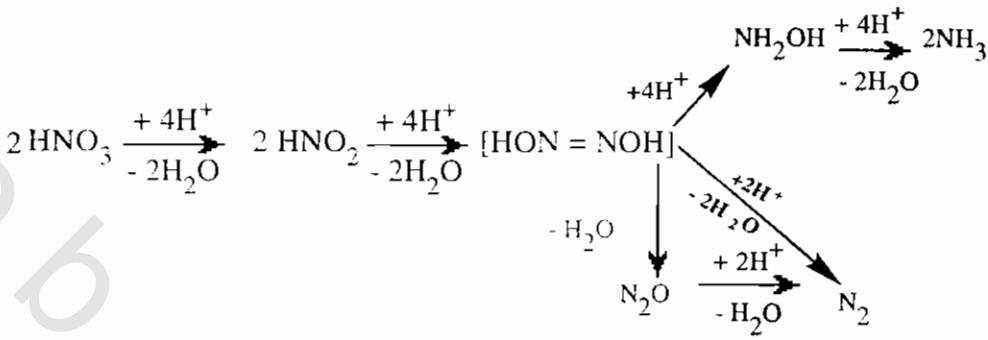
- أغلب البكتريا المختزلة للنترات Chemoorganotrophs .
- يوجد نوعين من الانزيمات الميكروبية التى تختزل النترات إلى نيتريت .

(١) assimilatory enzymes التى تحتوى الفلافين والمولبيدنم ويستخدم عادة $NAD\,(P)\,H.H^+$ كمعطى للأيدروجين والناتج هو الأمونيا أو مشتقاتها حيث تدخل فى تكوين مواد الخلية النتروجينية مثل الأحماض الأمنية والبروتين .

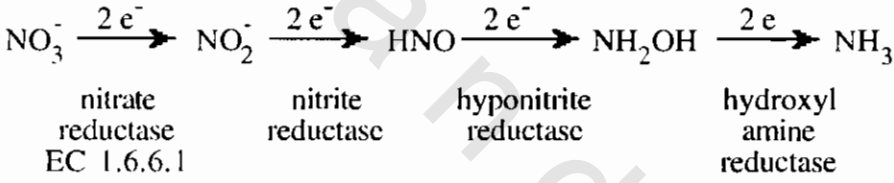
(٢) dissimilatory enzyenes التى تحتوى على حديد إضافى وتستخدم النترات كبديل للأكسجين والناتج هو النتروجين أو اكاسيد النتروجين التى تتطلب للجو وهو ما يعرف بالتنفس النتراتى اللاهوائى وهو ما سنتناوله بالتفصيل .

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 الستيوكروم وتستخدم النترات كبديل للأكسجين .

● شرح المعادلة العامة لاختزال النترات .

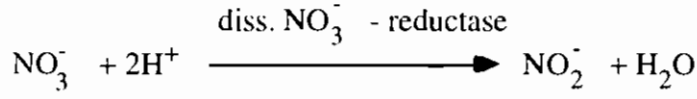


● اختزال النترات إلى أمونيا يحدث به تغير الكترونى من الحالة المؤكسدة للنترات (5^+) إلى الحالة المختزلة للامونيا (3^-) أى زحزحة عدد ٨ الكترونات ولكن لا تنتج عنه أى طاقة أو طاقة ضعيفة والانزيمات المسئولة عن استقبال هذه الالكترونات هى كما بالرسم .



وأكثرهم أهمية وشيوعاً ass. nitrate reductase وهو موجود على السيتوبلازم ويحتوى على المولبيدنم 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_2O) .

$$2\,NO_2^- + 4\,H^+ \xrightarrow{\text{diss. } NO_2^- \text{ - reductase}} N_2O + H_2O + 2OH^-$$

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

$$N_2O + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{diss. } N_2O \text{ - reductase}} N_2 + H_2O$$

أى أن بكتريا الدنترة يمكنها تكوين N_2O ، N_2 مباشرة من النيتريت لهذا يمكن تصور وجود مركب وسطى هو $N_2\,O_2\,H_2$:

$$N_2\,O_2\,H_2 \longrightarrow N_2O + H_2O \quad \text{(or)} \quad N_2\,O_2\,H_2 + 2H^+ \longrightarrow N_2 + H_2O$$

وهذا المركب يتكون من النيتريت بسهولة كالتالى :

$$NO_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow NOH + H_2O$$

$$2\,NOH \longrightarrow N_2\,O_2\,H_2$$

١٠٢٠٤ اختزال النترات تحت الظروف الاتوتروفيه

Chemelithotorphic 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-oxdizing autotroph والمعادلة التالية توضح هذا التفاعل .

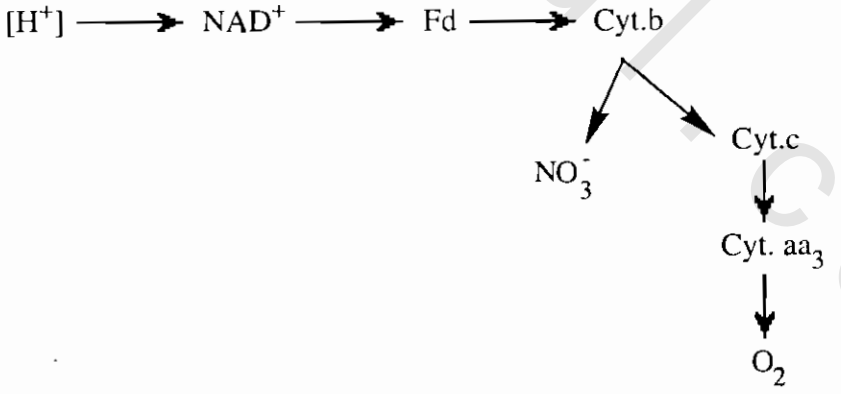
$$5\,S + 6\,NO_3^- + 2\,H_2O \longrightarrow 5\,SO_4^{=} + 3\,N_2 + 4\,H^+ + E$$

٢٠٢٠٤ اختزال النترات تحت الظروف الهيتروفية

Chemoorganotrophic reduction of nitrate

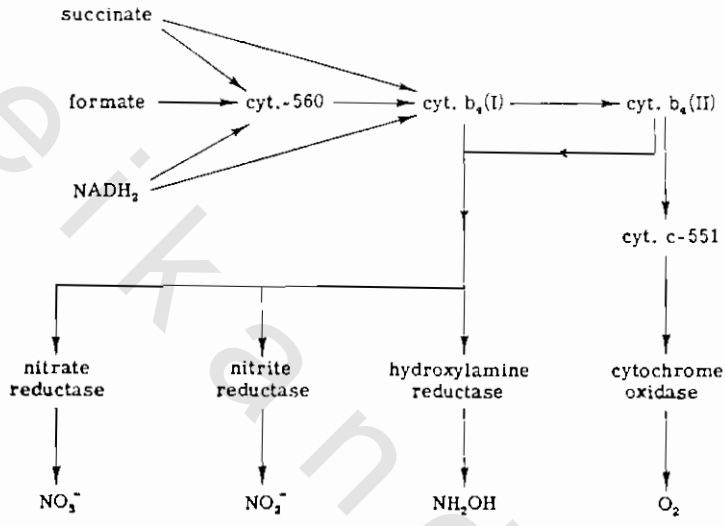
تنمو ميكروبات الدنترة هوائياً أو لا هوائياً اختياراً مستخدمة المواد العضوية أو الأيدروجين كمعطى للالكترون وتستخدم الأكسجين أو النترات (سواء في غيابه أو وجوده كما ثبت حديثاً) كمستقبل للالكترون وهى تملك نظام سلسلة انتقال الالكترونات وتقوم بعملية الفسفرة المؤكسدة لتكوين الطاقة اللازمة لنمو الميكروب فى صورة ATP ولكن مازال طول سلسلة انتقال الالكترونات وأماكن الفسفرة المؤكسدة محل خلاف ، فقد وجد فى بعض denetrifiers أنها تمتلك $Cyt.a+a_3$ ، Cyt.O ، Cyt.C والمعروف أنه تحت الظروف اللاهوائية الكاملة لا توجد فسفرة فى Cyt.C بإتجاه O_2 وتحدث الفسفرة لمادة التفاعل المنشطة بـ $NADH.H^+$ فى وجود النترات أو النيتريت .

وقد وجد Hohn & Whatly سنة ١٩٧٠ فى مستخلص الخلايا أن نسبة $P : NO_3^- = 1$ فى وجود $NADH.H^+$ (كمعطى للأيدروجين) أما فى وجود السكسينات فقلت إلى $P : NO_3^- = 0.4$ وقد أثبتا أيضاً أن انزيم nitrate reductase يتفاعل مع السلسلة التنفسية فى منطقة Cyt.b وأن Cyt.C لا يشارك فى اختزال النترات أى أن طول سلسلة انتقال الالكترون للخلايا النامية هوائياً مع الاكسجين تختلف عن النامية مع النترات كمستقبل للاكترون وتظهر كما يلى :



ولكن الأبحاث بعد ذلك أشارت إلى أن دخول الالكترونات يمكن أن يتم عند مستوى كل من Cyt. b ، Cyt. c ،وقد عزل حتى الآن خمس كروموبروتينات هى (I) $Cyt. b_4$،

وقد وجد أن الثلاثة brawn protein ، Cyt. C_{551} ، (HR) Cyt. c ، Cyt. b_4 (II) الأوائل تعمل فى الخلايا النامية هوائياً ولا هوائياً بينما يعمل Cyt. C_{551} دوراً مماثلاً لـ Cyt. C فى الثديات أما البروتين البنى فيعمل كمعطى الكترون مباشر لانزيم nitrate reductase وهناك دلائل تشير إلى أنه فى الحقيقة صبغة سيتوكرومية تحتوى على heme c ، like heme (a_2) ويعمل كانزيم NO_3^- - reductase كما بالرسم التالى :

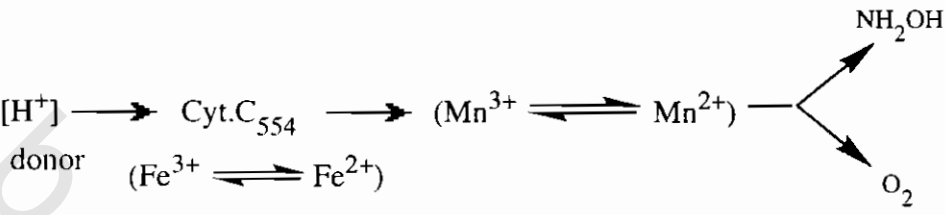


شكل (٤-٧) : سلسلة انتقال الالكترونات فى التنفس الهوائى واللاهوائى (النترانى) بواسطة ميكروبى *Micrococcus denitrificans , Pseudomonas aeruginosa* نقلاً عن Hori (1961)

وتشير الأبحاث الحديثة إلى تفضيل Cyt. C_{560} بدلاً من Cyt.b_4 كمنفذ لدخول الالكترونات حيث وجد أن nitrite neductase يتكون من اثنين من الهيموسيتوكروم يحتويان على C-type ، a_2 (d) - like heme وهذان السيتوكرومان يظهران فقط فى الخلايا النامية لاهوائياً مع النترات والنتيريت كمستقبل للالكترون . وقد وجد عند تنقية انزيم NO_2^- - reductase أنه يحتوى نشاط Cyt.c oxidase ولهذا استنتج أن Cyt.c and a_2 يشاركان فى عملية الاختزال كما أن انزيم NO_3^- - reductase ، NO_2^- - reductase يتفاعلان منفصلين وغير مرتبطين ببعضهما .

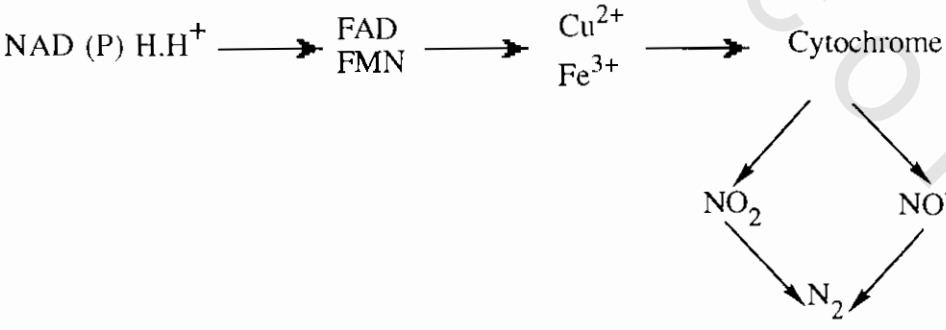
- أما الانزيم الثالث فى تفاعل الدنترة Denitrification فهو hydroxylamine

reductase وله القدرة على التفاعل مع الأكسجين ويمكن تصور دورة فى انتقال الالكترون كما يلى :

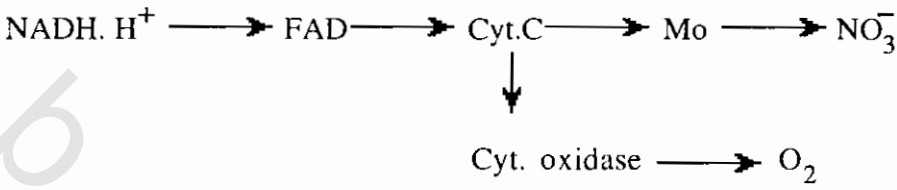


- والملاحظة الجديرة بالذكر أن نقطة التفرع فى nitrate reductase هو Cyt.b بينما فى كل من nitrite & hydroxylamine reductases تحتاج إلى Cyt.c والتنافس بين النترات والاكسجين يبدو أن سببه سحب الالكترونات عند مستوى Cyt.b لاختزال النترات .
- كما يبدو أن هناك اختلافاً جذرياً فى نظام اختزال النترات والنيتريت بين أفراد بكتريا الدنترة فمثلاً *Pseudomonas denitrificans* يختلف عن *Micrococcus denitrificans* حيث لم تشاهد عملية الفسفرة مع النيتريت كمستقبل نهائى للالكترون مع الميكروب الأول بينما تشاهد فى الثانى .

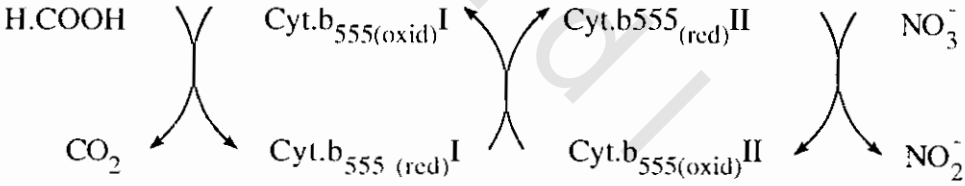
أما ميكروب *Pseudomonas Stutzeri* فيستخدم NAD (P) المختزل كمعطى للأيدروجين فى وجود FAD ، FMN اللذان ينشطان التفاعل ويمكن تصور سلسلة انتقال الالكترون بهذا الميكروب كالتالى :



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



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



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

● تأثير الأكسجين :

أُعتقد لفترة أن الأكسجين يثبط تكوين انزيمات الاختزال من منابعها البروتينية وظلت مشكلة هل انزيمات الاختزال Constitutive or adaptive ؟ مثار للخلاف حيث تختلف باختلاف الميكروبات إلا أن الأبحاث أشارت إلى أن تأثير الأكسجين لا ينصب على انزيمات redustases ولكن على تكوين السيتوكومات التى تحمل الالكترونات للانزيم المختزل . وأظهر مستخلص خلايا *Micrococcus denitrificans* محتوى سيتوكرومى عالى لنوعى b ، C إذا نمى الميكروب لا هوائياً على النترات عن الخلايا النامية هوائياً . وعلى العكس بعض *Staphylococcus* تنتج النتريت 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 النترات . وعموماً يمكن القول أن كل البكتريا التى تختزل النترات تحت الظروف الهوائية assimilatory تفرز NO_3^--reductase وتحتاج الاكسجين ليس كمستقبل نهائى للالكترون ولكن للتخليق الحيوى للسيتوكروم المحتوى على heme والذى يتوسط فى نظام نقل الالكترون فى عملية الاختزال .

ويعتبر Protoprophyrin IX هو المركب الأساسي (Key) فى عملية تخليق heme حيوياً حيث يتفرع لفرعين احدهما بدخول الحديد Fe^{2+} لتكوين الهيم والآخر بدخول الماغنسيوم Mg^{2+} لتكوين الكلورفيل . ويلعب الهيم دور المجموعة المرافقة Prosthetic group للهيموجلوبين كتاليز ، البيروكسيديز ، وبعض السيتوكرومات والانزيم الذى يحتاج لتدخل (لمشاركة) الأكسجين يطلق عليه Oxygenase . ودور الهيم يتلخص هنا فى اتحاده مع مكونات البروتين لسيتوكروم b لتكون $Cyt.b_1$ الذى يشارك فى نقل الالكترون للنترات بواسطة nitrate reductase .

وبعض البكتريا الهتيتروفيه 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 الكترون بديل (لم يعرف بعد) يمكن أن يحل محل الأكسجين لتحويل Co-protoprophyrin إلى protoprophyrin 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 النتراتى ومشتقاته إلى جزئ نيتروجين ينطلق فى الجو ويكمل دوره النتروجين فى الطبيعة .
- تتخلص من النترات ومشتقاتها بيولوچيا فى مياه الصرف والمجارى المعالجة .

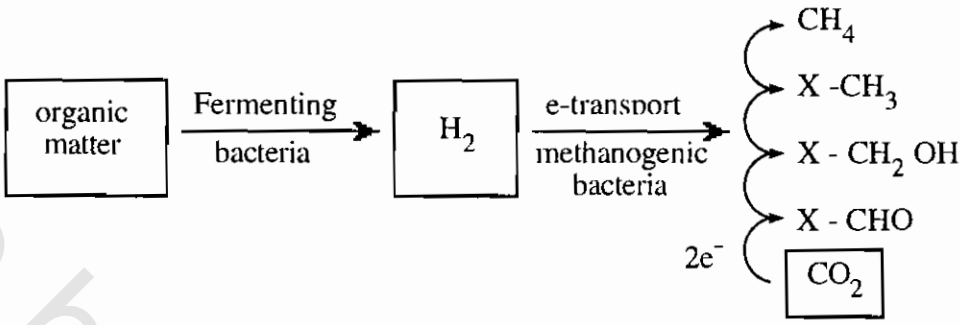
عيوبها :

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

٣٠٤ ك أ٢ كمستقبل للالكترونات Carbonate respiration

١٠٣٠٤ تكوين الميثان

- يستخدم ك أ٢ بواسطة مجموعة صغيرة من البكتريا كمستقبل نهائى للالكترون والناتج المختزل هو الميثان وتعرف ببكتريا إنتاج الميثان methanogenic bacteria or methane producing bacteria .



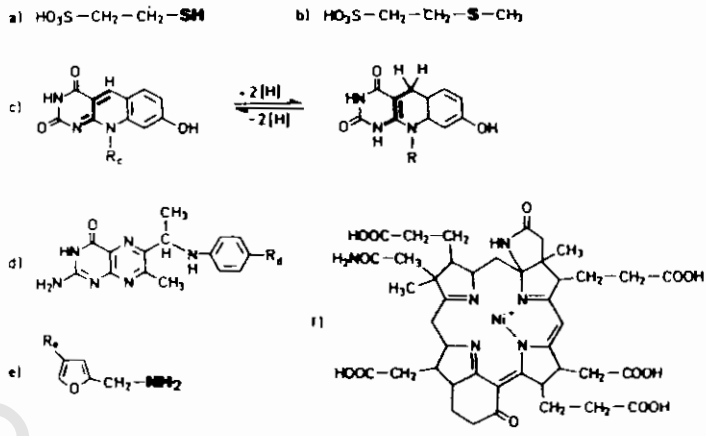
وهى تختلف عن بكتريا أكسدة الميثان الهوائية methane oxidizing bacteria التى تؤكسد الميثان إلى ك أ٢ ، يد٢أ والتى سيلى ذكرها فيما بعد .

- وبكتريا الميثان ذات شكل عصوى *(Methanobacterium)* أو كروى *(Methanococcus)* أو مكعبى *(Methanosarcina)* أو خيطيى *Methanospirillum or Methanothrix* وهى تتبع Archaebacteria التى تختلف عن باقى البكتريا فى عدم احتواء جدرها الخلوية على peptidoglycan ولا تثبط 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 تركيزة سمية للميكروبات المنتجة له أى تبادل منفعة بالاشتراك ولذا تعرف بكتريا إنتاج الميثان بالبكتريا المؤكسدة للأيدروجين H_2-oxidizing bacteria .

- **كيفية تكوين الميثان والحصول على الطاقة :**

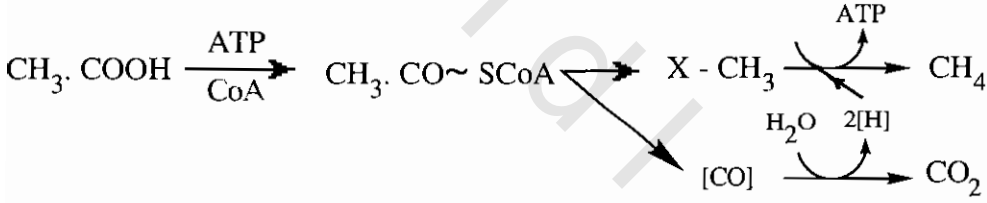
يتضمن التحول البيوكيماوى لـ H_2 ، CO_2 إلى الميثان أو للاستيات إلى الميثان ، ك أ٢ العديد من المرافقات الانزيمية و Prosthetic groups والتى لاتوجد إلا فى بكتريا انتاج الميثان مثل methanopterin ، methanofuran ، deazariboflavin (F420) ، Co-nickel-tetrapyrid (F430) ، enzyme M (mercaptoethane sulphonate) كما فى شكل (٤ - ٨) التالى :



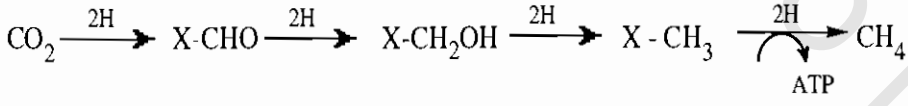
(a) Coenzyme M; (b) methyl-coenzyme M; (c) F_{420} (deazariboflavine derivative); (d) methanopterin; (e) methanofuran; (f) factor F_{430} (after dissociation of methyl-coenzyme M methylreductase). The reactive groups of the compounds (d) and (f) are not indicated. R_{a-e}, various side chains consisting of several components.

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

ويتكون الميثان من الإستيات كالتالى :



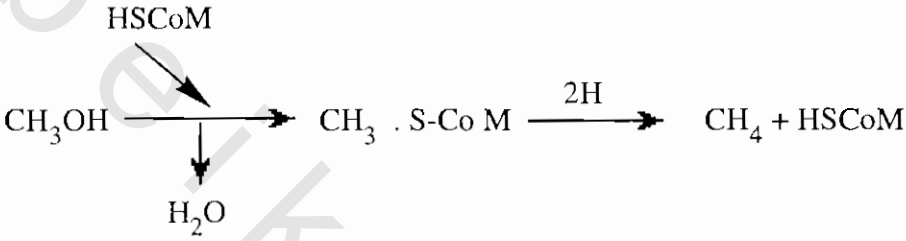
كما يتكون الميثان من ك أ ، يدم مباشرة كما بالمعادلة .



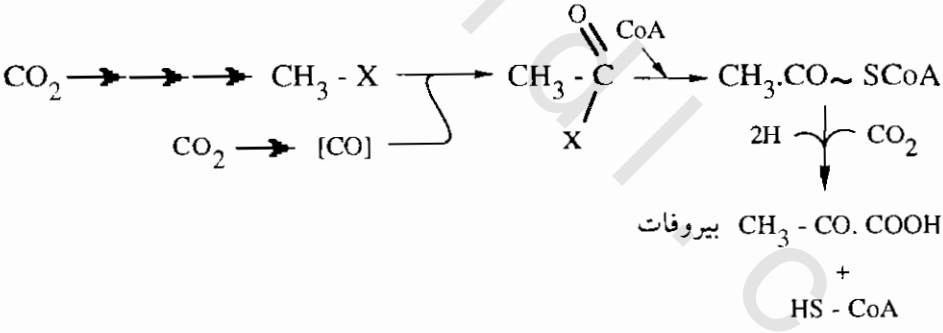
ومازالت ميكانيكية تكون ATP غير ثابتة ماعدا الخطوة الأخيرة حيث ثبت أن لها جهد ثرمو ديناميكي يكفى لتخليق ATP . وأغلب الظن أن التفاعل يصاحبه خروج بروتون من الخلية مما يخلق جهد بروتونى بين جانبى الغشاء ويكفى لحدوث عملية الفسفرة المصاحبة

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

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



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



وتفسير ذلك أن ك أ يختزل إلى مستوى الميثانول (CH_3-X) بينما جزئ آخر من ك أ يختزل إلى ك أ بواسطة الديهيدورجنيز وتحدث عملية Carboxylation لمركب methyl-x الذى يتحول إلى aetyl-x ثم إلى استيل كوانزيم A ويعقب ذلك عملية reductive Carboxylation تؤدى 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 أ٢ وأكسدة الايدروجين كما يلى :

$$4\,H_2 + 2\,CO_2 \longrightarrow CH_3.\,COOH + 2\,H_2O$$

$(\Delta\,Go = -\,26.6\ kcal/mole)$

وهذه الميكروبات عضويات سالبة لجرام مثل :

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

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

وهى تمثل ك أ٢ أوتوتروفيا وتخلق مادة خلاياها من خلال استيل كوانزيم A والبيروفات – مثل بكتريا الميثان – حيث يتم اختزال ك أ٢ إلى $methyl\text{-}FH_2$ عبر الفورمات مع استخدام tetrahydrofolate كمرافق انزيمى . ثم تحدث عملية اضافة ك أ٢ مختزلة لاستيل كوازيم A – كما فى الشكل السابق – ينتج عنه البيروفات الذى يدخل فى الدورات المعتادة .

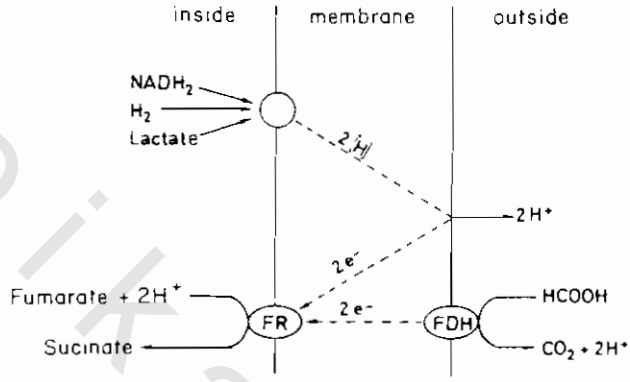
٣٠٣٠٤ تكوين السكسينات من الفيومارات

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

$$2\,[H] + \text{Fumarate} \longrightarrow \text{Succinate}$$

وفرق جهد الأكسدة والاختزال (E_0) بين فيومارات / سكسينات عالى نسبياً (حوالى -30 mV) ولهذا تستقبل الالكترونات المحمولة على المرافقات الانزيمية الناقلة للأيدروچين

($NAD\ H/H^+$) واختزال الفيومارات يسمح بحدوث الفسفرة المصاحبة لانتقال الالكترون . ويعرف هذا التنفس اللاهوائى - باعتبار الفيومارات المستقبل النهائى للالكترون - بتنفس الفيومارات Fumarte respiration وميكانيكيته 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 بروتونى على جانبى الغشاء السيتوبلازمى وبالتالى إمكانية حدوث عملية الفسفرة وتكوين الطاقة (ATP) .

وينتشر التنفس الفيوماراتى فى كثير من البكتريا اللاهوائية الهيتروتروفيه مثال ذلك أجناس *Escherichia , Klebsiella , Salmonella , Proteus* وأيضاً *Vibrio Succinogenes , Propionibacterium* حيث لوحظ أن إضافة الفيومارات للبيئة يسبب نمو أسرع وكميه خلايا أعلى والفيورمارات يمكن إضافتها خارجياً للبيئة أو أنها تتكون داخلياً من الكربوهيدرات عبر الاكسالواستيات والمالات .

٤٠٤ اختزال الحديديك Fe^{3+} إلى حديدوز Fe^{2+}

يمكن لبعض المزارع المختلطة من ميكروبات التربة اختزال الحديديك وذلك فى وجود النترات التى تختزل أيضا لنيترتيت ونيتروچين . ويبدو أن انزيم nitrate reductase A يقوم بنقل الالكترون إلى الحديديك 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 $E_o = + 770$ mV يجعل التفاعل ذو ديناميكية حرارية .

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

أسئلة للمراجعة

١ - ما هو التنفس اللاهوائى ؟

٢ - آذكر أربعة من المجاميع البكتيرية الرئيسية التى تستخدم المركبات الغير عضوية كمستقبل نهائى للالكترون .

٣ - اشرح الديناميكية الحرارية لاختزال الكبريتات فى وجود الأيدروچين .

٤ - ما هو الفرق بين اختزال الكبريتات فى Desulforicants والخمائر ؟

٥ - لماذا يعتبر Desulfovibrio ميكروب أوتوتروفى ؟

٦ - ما هو الفرق بين اختزال الثيوسلفات فى ميكروبى *Desulfovibrio desulforicans & Thiobacillus denitrificans* ؟

٧ - ناقش الدور الذى يقوم به كل من APS , $Cyt.C_3$, 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 النترات *assimilatory & dissimilatory* ؟

١٠- ناقش الديناميكية الحرارية لاختزال النترات .

١١- اشرح أهمية الهيم فى اختزال النترات .

١٢- اذكر أربع أسماء لاجناس البكتريا المنتجة للميثان ولماذا يمكن تسميتها « بكتريا اختزال ك أ٢ أو بكتريا أكسدة الأيدروچين» ؟

١٣- اشرح كيفية حدوث اختزال ك أ٢ 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 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. C_{553} and brown protein. J. Biochem. (Tokyo) 50 : 481.
9. Iwasaki, H. and Shidava, S. (1969). Crystallization of cyt. 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. Mierobial 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_2 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 sulfer 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.