الباب السادس
التنفس الهوائى

Chemolithotrophic bacteria

obeikandi.com

obeikandl.com

الباب السادس

التنفس الهوائـى

Chemolithotrophic bacteria

يحتوى التنـفس الهوائى على عدد أكبر من الـعمليات الايضية عن التخـمر أو التنفس اللاهوائى .

ولقد اهـتمت أغلب الـكتب والمراجع الخـاصة بهذا الموضـوع بدورة حمض الـستريك (TCA) كنموذج لـلتنفس الهوائى . ولـكن فى عالم الميكـروبيولوچى توجد مجـموعة من الميـكروبـات الـغير قـادرة عـلـى استعـمال TCA وتعـرف هـذه الميـكروبـات "Chemolithotrohps" وهى أساساً أوتوترفيـه وتشتق طاقتها من أكسدة المواد الـكيمياوية المعدنية فى وجود جزئ الاكـسچين كمستقبل نهائى للالكترون . وتـستطيع تمثيل ك أ$_2$ إلى مادة الخلية من خلال دورة كالفن .

أما الأغلبية الباقية من الميكروبات الهوائية التى تعرف "Chemoorganotrophs" فهى تشتق طاقتها من أكسدة المواد العضوية «كمـعطى للايدروچين» فى وجود الاكسچين «مستقبل الالكترون» .

وسنتكلم فى هذا الباب بالتفصيل عن Chemolithotrophs وهى عبارة عن عدد قليل من المجاميع البـكتيرية القادرة على أكسدة المواد الـغير عضوية لتكوين الطـاقة وهذه المجاميع هى :

(١)	Nitroso - group	التى تؤكسد الامونيا
(٢)	Nitro - group	التى تؤكسد النيتريت
(٣)	Hydrogen bacteria	التى تؤكسد الايدروچين
(٤)	Fe^{2+} - oxidizing b.	التى تؤكسد الحديدوز
(٥)	S- oxidizing bact .	التى تؤكسد الكبريت

obeikandl.com

١٠٦ بكتريا التأزت Nitrifying bacteria "Nitroso - group"

وهى تتبع عائلة Nitrobacteriaceae وتقع فى أجناس *Nitrosomonas* ، *Nitrosococcus* ، *Nitrosocystis* ، *Nitrosoglea* ، *Nitrosospira* ، *Nitrosolobus* ، ويمكن تنميتها فى بيئات معدنية نقية .

- هذه الميكروبات تؤكسد الأمونيا إلى النيتريت تبعاً للمعادلة :

$$NH_4^+ + \frac{3}{2} O_2 + H_2O \longrightarrow NO_2^- + 2 H_3O^+$$

وهذا التفاعل يتضمن انتقال ٦ الكترونـات مسبباً تغير حالة ذرة النيتروچين من -3 إلى +3 وحيث أن الانتقال الالكترونى العادى يتكون من ٢ الكترون فإنه تحدث سلسلة من ٣ خطوات تتكون خلالها الطاقة والقوة الاختزالية اللازمة للخلية .

- عند تعرض الخلية إلى hydrazine فإن الامونيا لا تتأكسد إلى النيتريت ولكن يتراكم هيدروكسيل امين كمركب وسطى :

$$NH_4^+ + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow NH_2OH + H^+$$

وهذه الخطوة تحتاج لطاقة endergonic وتلامس بواسطة انزيم monooxygenase . وذرة الاكسچين فى NH_2OH تأتى من جزئ الاكسچين .

والتغير فى الطاقة الحرة (ΔF) عند pH 7.0 تقدر كالتالى :

$$NH_4^+ (-19.0) + \frac{1}{2} O_2 (0.0) = NH_2OH (-5.6) + H^+ (0.0)$$

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

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

$$NH_2OH\ (-5.6) + O_2\ (0.0) = NO_2^-\ (-8.25) + H_2O\ (-56.7) + H^+\ (0.0)$$

$$\Delta F = -59.4\ kcal/mole$$

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_2O ، N_2 تحت الظروف اللاهوائية .

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

١ - نزع الأيدروجين من الهيدروكسيل وتكوين Nitroxyl .

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

$$NH_2OH + 2\ Cyt.\ C\ Fe^{3+} \longrightarrow (NOH) + 2\ Cyt.\ CFe^{3+} + 2H^+$$

$$(NOH) + HNO_2 \longrightarrow NO_2\ .\ NHOH$$

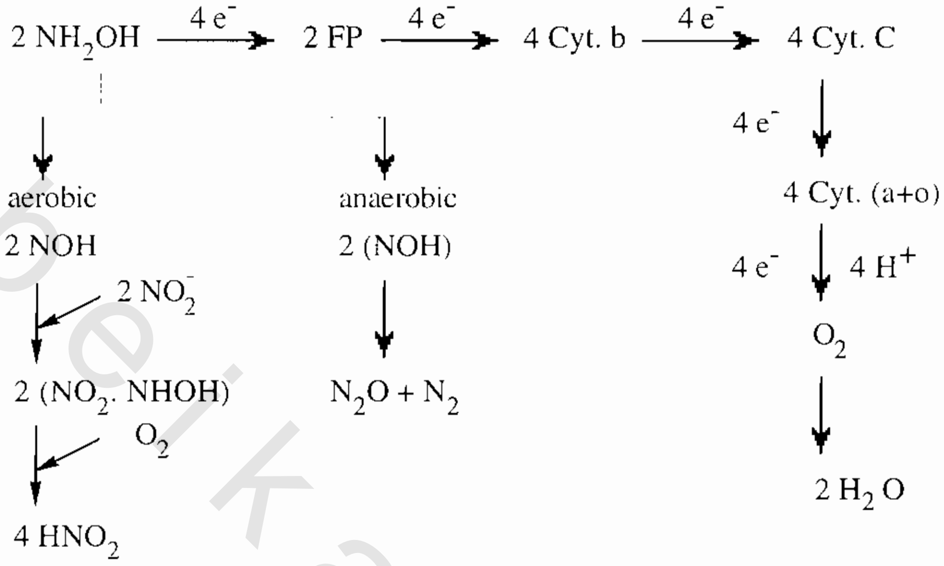
$$NO_2\ .\ NHOH + \frac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow (2)\ HNO_2$$

$$2H^+ + 2\ Cyt.\ CFe^{2+} + \frac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow 2\ Cyt.\ CFe^{3+} + H_2O$$

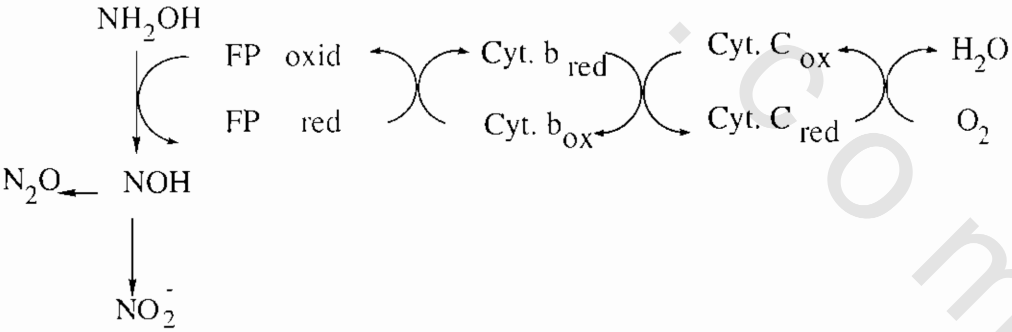
$$NH_2OH + O_2 \longrightarrow HNO_2 + H_2O$$

obeikandi.com

وفى ضوء المعلومات السابقة فإن التفاعل المتضمن أكسدة الهيدروكسيل امين يبدو كما بالرسم التالى :



- وجدير بالذكر أن جهد الاكسدة والاختزال لنظام NH_2OH / NO_2^- حوالى + 0.066V أى (+ 66 mV) وهو لا يكفى لتوصيل انزيم Hydroxylamine dehydrogenase إلى مستوى $NAD^+/NADH.H^+$ فى النظام التنفسى (حوالى - 320 mV) ولذا فالدخول يتم عند مستوى الفلافوبروتين ويتضمن خطوتين لخفظ الطاقة على الأقل كما بالرسم .

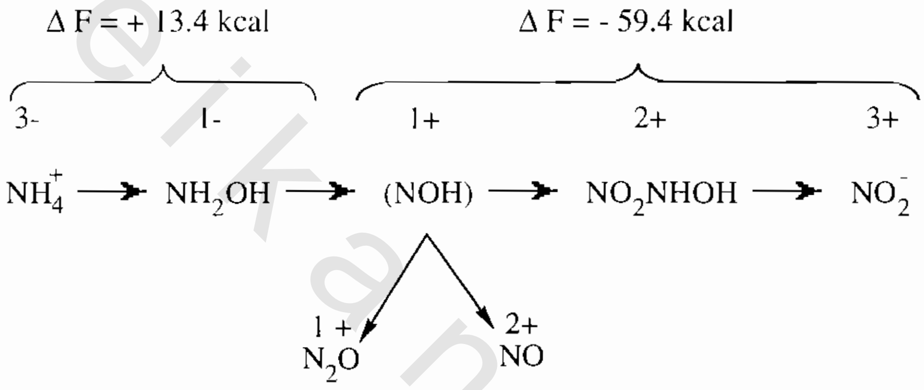


opeikandi.com

والمركبات الوسطية بين NOH ، NO_2^- فليس هناك تعريف محدد لها بعد مثل $NO_2.NHOH$ المذكور سابقاً والذى يحتاج NO_2^- لتكوينه . اما إمكانية اعتبار N_2O كمركب وسطى فقد صرف النظر عنها لحتمية أن المركب الناتج لأن يكون عند مستوى أكسدة (+2) وهناك زعم آخر بتكوين المركب (NO) كوسط بينهما .

«وعموماً فإن التصورين المقترحين للمركبات الوسطية فى أكسدة الامونيا إلى النيتريت يمكن تحديدهما كالتالى» .

الاقتراح الأول



الاقتراح الثانى

$$\overset{3-}{NH_4^+} \longrightarrow \overset{1-}{NH_2OH} \longrightarrow \overset{1+}{(NOH)} \longrightarrow \overset{2+}{NO} \longrightarrow \overset{3+}{NO_2^-}$$

شكل (٦-١) : العلاقة بين المركبات الوسطية فى أكسدة الامونيا بواسطة *Nitrosomonas*

- وتستطيع هذه الميكروبات استخدام ك أ٢ كمصدر كربونى وحيد للنمو وتمثيله إلى مادة الخلية عبر دورة كالفن وهذه الميكانيكية عكس التنفس . وبما أن ك أ٢ ذو حالة مؤكسدة أعلى بكثير جداً من بقية المواد العضوية فإنه يحتاج إلى قوة اختزالية فى صورة $NADH.H^+$ لاختزاله وتثبيته . وحيث أن جهد الأكسدة والاختزال لنظام $NAD^+ / NADH.H^+$ عالى جداً (-320 mV) مقارنة بنظام NH_2OH / NH_4^+ (حوالى +394 mV) أو بنظام NO_2^- / NH_2OH (حوالى +66 mV) . فإنه فى

obeikandi.com

الحالتين الاخيرتين لا تستطيع الالكترونات الانتـقال من أكسدة الامونيا أو الهيدروكسيل امـين إلـى $NAD(P)^+$. وهـذه المشـكلـة تعـتبـر صفـة مميـزة لكـل الميـكروبـات Chemolithotrophs .

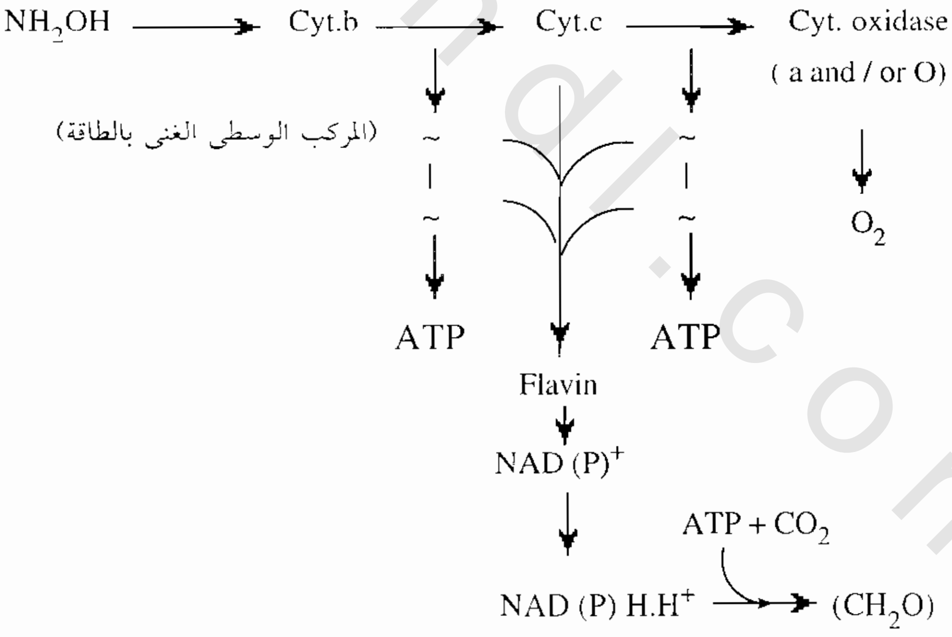
ولهذا يعتقد أن هـناك انسياب الكترونـى عكسى من $Cyt.\ C\ Fe^{2+}$ إلى NAD^+ أو $NADP^+$ فى وجود الفلافوبروتـين . وهذا النظام يحتاج لطاقة والتـى تأتى اما بأكسدة الهيدروكسيل امين أو بواسطة ATP خارجى كما بالمعادلة .

$$ATP + (x) \longrightarrow (\sim x) + ADP + Pi$$

$$AH_2 + (\sim x) + NAD\,(P)^+ \longrightarrow A + NAD(P)\,H.H^+ + (x)$$

حيث أن AH_2 يمكن أن يكون هيدروكسيل امين أو سكسينات 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 سلـسلة انتقال الالكترون وتكويـن المواد الغنية بالطاقة والتـى تستخدم فى تثبيت ك أ٢ فى Nitroso - group كما يلى :



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

obeikandl.com

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

- أهمية عملية التأزت Nitrification :

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

٢ - الامونيا أكثر أو إدمصاصا على حبيبات التربة والدبال بينما النترات سهل غسيلها وفقدها 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 والمبانى بسبب أكسدة الأمونيا فى الجو إلى حمض النيتريك المذيب القوى.

٢٠٦ بكتريا التأزت "Nitro"- group

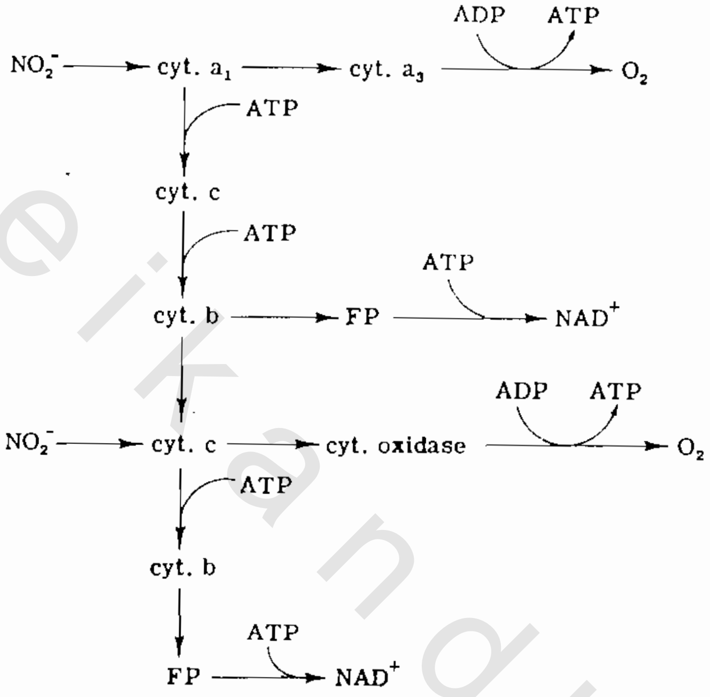
وتتضمن جميع أنواع البكتريا التى تستطيع أكسدة النتيريت إلى النترات مثل اجناس *Nitrobacter* ، *Nitrococcus* ، *Nitrospira* ، *Nitrocystis* .

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

$$NO_2^- \longrightarrow \text{Cyt. C} \longrightarrow \text{Cyt. oxidase} \longrightarrow O_2$$

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

الالكترونات الناتجة من أكسدة النيتريت عند مستوى Cyt. C مشكوك فيه وإنما يتصور دخول الالكترونات عند مستوى $Cyt.\ a_1$ وعندئذ يحدث انتقال الكترونى عكسى منشط بالطاقة من $Cyt.\ a_1$ لاختزال Cyt. C ويظهر الرسم التالى كلا الاحتمالين .



شكل (٦-٣) : نظام انتقال الالكترونات العكسى فى *Nitrobacter sp.*

- وقد أمكن إثبات أن الماء - وليس جزئ الاكسجين - يدخل فى أكسدة NO_2^- إلى NO_3^- وأن معطى الأيدروجين لاختزال NAD^+ هو الماء أيضاً وذلك باستخدام $^{18}O_2$ والماء الثقيل H_2O^{18} . فالنيتريت يعطى الالكترونات أولاً إلى السيتوكروم (سلسلة انتقال الالكترون) كما فى تفاعل (١) والتى تستقبل فى النهاية بواسطة جزئ الاكسجين (تفاعل ٣) ويقابل ذلك تكوين ATP كما تظهر ذلك المعادلات التالية :

$$(1)\ NO_2^- + n\,ADP + n\,Pi + H_2O \longrightarrow NO_3^- + n\,ATP + 2H^+$$

$$(2)\qquad NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{E} NADH.H^+$$

$$(3)\ NADH.H^+ + ADP + Pi + \frac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow NAD^+ + ATP + H_2O$$

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* آن 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 ٤-٥ مول ATP .

وتتركز معظم التساؤلات حول كيفية التغلب على الفجوة الثرموديناميكية thermo dynomic gap بين NO_2^- / 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 هدرجه النيتريت أو اشتراك مكون فوسفاتى غنى بالطاقة بما يتجاوز هذا الـ gap .

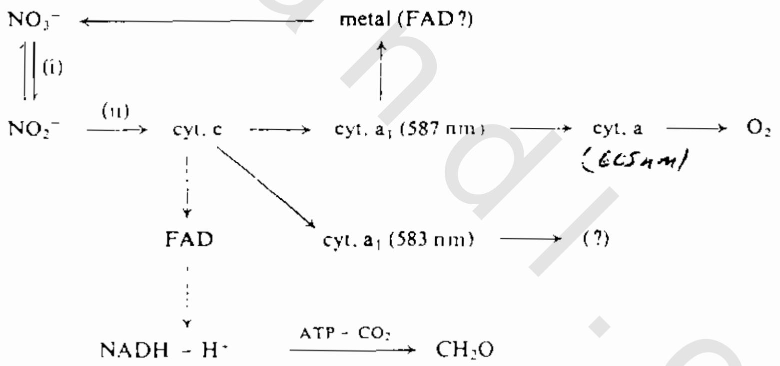
وبضرف النظر عن تصورات دخول الالكترونات إلى سلسلة الانتقال فإن *Nitrobacter* يمتلك موقعاً واحداً فقط للفسفرة المؤكسدة عند مستوى Cyt. oxidase أو Cyt. a_3 . ويستخدم جزء من الطاقة المنطلقة فى اختزال ك أ٢ وتمثيله والجزء الآخر فى تكوين NAD (P) المختزل . وثبت أن أكسدة امول من النيتريت يعطى تقريباً 17.5 Kcal 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 الأكسدة ولكن من تأثير الاكسجين على تمثيل ك أ٢ حيث وجود ٩٥ ٪ أكسجين (حجمياً) يثبط عملية تمثيل ك أ٢ تماماً فى ميكروب *Nitrobacter winogradsky* . وفى نفس التجربة وجد أن

انقاص الاكسجين الذائب إلى 2 mg O_2 / L (حوالى ٢٧ ٪ من التشبع) كان كافياً لنمو *Nitrobacter* بينما التركيز الادنى لميكروب *Nitrosomonas* كان 0.9 mg O_2/l . وعموماً فمن قياسات الاكسجين الذائب والتغير فى النتروجين المعدنى يمكن استنتاج أن النسبة المثلى للنمو كانت 1 : 3.22 فى حالة أكسدة الامونيا إلى النيتريت بينما كانت 1 : 1.11 فى حالة أكسدة النيتريت إلى النترات .

وهذا الفصل بين تحولات الطاقة وبين تمثيل ك أ٢ يؤيد أن *Nitrobacter* يمتلك سلسلة تنفسية (Cyt. c, b, a and a_1) التى تعمل غير مرتبطة بتكوين القوة الاختزالية وبالتالى تمثيل ك أ٢ .

وتشير سلسلة انتقال الالكترونات فى الرسم التالى إلى أن الالكترونات تنتقل من السيتوكروم البكتيرى C إلى مكونى Cyt. a_1 (درجة امتصاصهما عند 583 nm ، 587) ومن Cyt. a_1 (587 nm) تنتقل الالكترونات اما مباشرة إلى النترات فى وجود FAD أو خلال Cyt. a (605 nm) إلى الاكسجين فى وجود الموليبد نم .



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

وميكروب *Nitrobacter agilis* لا يؤكسد النيتريت فقط ولكن يملك انزيمات NO_3^-، NO_2^- ، NH_2OH- reductases تحت الظروف اللاهوائية حيث يختزل النترات إلى الامونيا وهذا لا يجعل الميكروب denitrifier حيث لا يكون جزئ N_2 ، N_2O وإنما يعتبر اختزال نترات بنائى assimilatory حيث تدخل الامونيا فى تكوين

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

كما أن ميكروبات التأزت *Nitrobacter* ، *Nitrosomonas* تستطيع اختزال الكبريتات assimilatory حيث تختزل الكبريتات عبر APS ، PAPS ويمتلك انزيمات Sulfate adenyltransferase ، adenylsulfate 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 أ٢ . حيث تمثل الاسيتات إلى poly-β-hydroxy butyrate وزيادة النيتريت تزيد تمثيل الاسيتات بوضوح اما فى غياب النيتريت فالميكروب يحول الاسيتات ببطء إلى ك أ٢ ، يد٢أ . وكل انزيمات TCA موجودة بالكائن وأضافة النيتريت يزيد تمثيل الاسيتات assimilation إلى مادة الخلية . ووجود الاسيتات والكازين المتميئ لا يفقد الميكروب إطلاقاً قدرته على النمو الاوتوثروفى على النيتريت ، ك أ٢ . ويظل متوسط محتواه من C+G فى DNA حوالى 61.2 ± 1% سواء نمى الميكروب اوتوتروفيا أو هتروتروفيا .

أيضاً ثبت أن ميكروب *Nitrobacter agilis* يحتوى على Formate oxidase الذى يؤكسد الفورمات إلى ك أ٢ ، يد٢ أ . أما النمو على الفورمات كمصدر وحيد للكربون لم يثبت معملياً جدواه .

٣٠٦ بكتريا اكسدة الايدروجين

Hydrogen bacteria (Knallgas bacteria)

وهى البكتريا التى لها القدرة على أكسدة الايدروجين فى وجود الاكسجين كمستقبل للالكترونات مع تثبيت ك أ٢ عن طريق دورة الريبولوز بيوفوسفات (دورة كالفن) والمعادلة العاملة لذلك .

$$CO_2 + 6\,H_2 + 2\,O_2 \longrightarrow (CH_2O) + 5\,H_2O$$

وهى بكتريا عصويه أو كرويه موجبة أو سالبة لجرام تـقع فى آجناس مختلفة تقسيمـياً مثـل *Pseudomonas* ، *Paracoccus* ، *Aquaspirillum* ، *Alcaligenes* ، *Xanthobacter* (السالبة الجرام) ، *Nacordia* ، *Bacillus* ، *Mycobacterium* (الموجبة لجرام) وهذه البكتريا mixotroph أى لها القدرة على النمو اتوتروفـيا او هيترتروفيا ولكنها هوائيـة حتمية وبـعضها يسـتخدم بدائل الاكسـچين كمستـقبل للالكـترونات مثل الـنترات والكبريتات والكربونات (تنفس تحت ظروف لاهوائية) ومن أمثلة ذلك.

Paracoccus denitrificans

$$2\,NO_3^- + 5\,H_2 + 2\,H^+ \longrightarrow N_2 + 6\,H_2O$$

Desulfovibrio vulgaris

$$SO_4^= + 4\,H_2 \longrightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$$

Methanobacterium sp

$$CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O$$

وليس هنا مجال الحديث عن التنفس اللاهوائى حيث سبق شرحه فى الباب الرابع .

ولـــذا فالحديـث مقـصور علـى التـنفس الهـوائى بـاستخـدام الاكسـچين كمسـتقـبل للالكترونات .

- أثناء تنـمية بكتريا الهـيدروچين فإنها تسـتهلك $H_2/O_2/CO_2$ بنسـبة ١ - ٢ : ٦ لتثبيت ك أ٢ كما بـالمعادلة العامـة المذكورة سابقاً وذلـك فى وجود Hydrogenase لتنشـيط جزئ الايدروچين . والقـوة المختزلة $NADH_2$ وكذا ATP اللازمين لعملية تثبيت ك أ٢ يتحصل عليهما من الفسفرة المؤكسدة e-transport phosphorylation .

- اثبـتت الـدراسات علـى مسـتخـلص *Hydrogenomonas* H16 ان نـشاط انـزيم hydrogenase يمكن فصله إلى جزء ذائب وآخر مرتبط والجزء الذائب يلامس اختزال NAD^+ بواسطة جزئ الايدروچين ولا يحتاج إلى Co-factors وهذا الجزء يتأثر تأثراً

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 أ٢ .

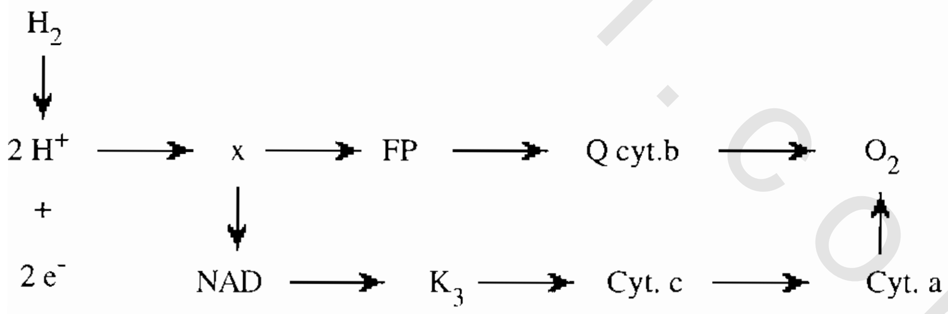
أما الجزء الثانى فمرتبط بالغشاء ويختزل أزرق الميثلين والاكسچين كمستقبل فسيولوچى للايدروچين . وهو يدخل فى سلسلة انتقال الالكترونات التى تلازم الفسفرة المؤكسدة وهناك بعض الدلائل على وجود $NADH_2$ - oxidase (EC 1.6.99.3) الذى يلامس أكسدة $NADH.H^+$.

$$NADH.H^+ + O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O_2$$

أى أنه يمكن القول أن بكتريا أكسدة الايدروچين بها نوعين من انزيمات Hydrogenases لهما وظيفتين مختلفتين مثل البكتريا الفوتوثروفية . احدهما مرتبط (Particulate) بعملية فسفرة ADP إلى ATP والثانى (Soluble) ينقل الالكترونات إلى الاكسچين 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 *Alcaligins eutrophus* .

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



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

opeikandi.com

- ويعتقد أن الفسفرة المؤكسدة لـلايدروچين تتحدد فى الخطوات ما بين H_2 ، Cyt. b .
وباعتبار ك أ$_2$ كمصدر وحيد للـكربون والهيدروچين كمعطى وحيـد للالكترونات فإن تفاعلات الطاقة لميكروب *Hydrogenomanas* تتبع المعادلة التالية :

$$CO_2 + 2\,H^+ \longrightarrow (CH_2O) + H_2O \quad \Delta F = +8.2$$

$$H_2 + O_2 \longrightarrow H_2O \quad \Delta F = -56.3$$

$$CO_2 + 2\,H_2 + O_2 \longrightarrow (CH_2O) + 2\,H_2O \quad \Delta F = -48.3 \text{ Kcal.}$$

ومن قياسات الطاقة يتبين أن امول H_2 ينتج ما يعادل ٢ مول ATP . ويحتاج ٥ مول ATP لتحويـل امـول ك أ$_2$ إلى مادة الخلـية أى يحتاج ٥ مول H_2 لتمثيل ٢ مـــول ك أ$_2$.

وبكتيريا الايدروچين قـادرة على تخليق حامض بولى هيدروكسى بيـوتيريك ليس فقط هتيـروتروفيا من الـبيروفات والاستيـات ولكن اوتوتروفـيا من ك أ$_2$ من خـلال دورة كالفين.

ولقد افترض Schlegel سنة ١٩٦٦ التصورين التاليين :

(أ) يتكون استيتل كوانزيـــم A من ٣ - فـوسـفو جليسرات عبر البيـروفات وتفاعل نزع ك أ$_2$ Decarboxylation .

(ب) يتكون استيتل كوانزيم A من الـفركتوز ٦- فوسفات أو الريـليلوز ٥ - فوسفات عبر تفاعل phosphoketolase (PK) .

وحيث أنه لا يوجد تفاعل PK فى بكتريا الايدروچين فإن الافتراض الأول هو الطريقة الوحـيدة الممكنة والانـزيم الذى يلامس هذا التفاعـــل هـو بيروفـــات ديهيدروجينير (EC 1.2.4.7) .

$$\text{Pyruvate} + \text{COA - SH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{DH}} \text{acetyl - COA} + CO_2 + \text{NADH.H}^+$$

- وتحت الظروف الهيتروتروفية فإن بكتريا الايدروچين تستخدم دورة حمض الستريك (TCA) كمصدر تخليق ATP وسحب استيل كوانزيم A من هذه الدورة لتخليق بيتاهيدروكسى بيوترات سيكون على حساب تخليق ATP حيث لن تعمل دورة TCA بطريقة مثلى .

- وعموماً استيل كوانزيم A المتكون عبر النمو الاتوتروفى أو الهيتروتروفى لبكتريا الايدروچين يحدث له عملية Carboxylation إلى malonyl CoA الذى يدخل فى تكوين بولى هيدروكسى بيوترات . وتكوين المالونات يبدو كخطوة أولية لتخليق الليبيدات أو البروتينات فى وجود مصدر N . وسرعة تكوين هيدروكسى بيوترات أسرع بكثير تحت الظروف الهيتروتروفيه عن الاتوتروفية .

- وتستطيع بكتريا الايدروچين استخدام بعض الكربوهيدرات كمصدر للكربون مثل الجلوكوز والفركتوز والريبوز والجلوكونات . وتتم تحولات الجلوكوز عبر دورة Entner & Doudoroff (ED) ، ويدل وجود انزيم 6-phospho gluconate dehydrogenase فى بعض بكتريا الايدروچين على حدوث نشاط عن طريق دورة HMP .

- "Hydrogen effect" وهى ظاهرة تطلق على التأثير المثبط لجزئ الايدروچين على تكوين الانزيمات لدورة ED مما يسبب نقص فى معدل النمو أو تكوين هيدروكسى بيوترات بنسبة ٨٠ ٪ . وتستطيع بكتريا الايدروچين 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 الايدروچين .

٤٠٦ بكتريا أكسدة الحديد Iron-Oxidizing bacteria

تتم تحولات الحديد الميكروبية من خلال طريقين :

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

Ferrobacillus ferrooxidans , Gallionella , Thiobacillus ferrooxidans

٢ - بواسطة الميكروبات الغير متخصصة والتى تستطيع تحويل بعض المواد العضوية المحتوية علـى الحـديـدوز وينطلق الحـديديك فى صورة $Fe(OH)_3$ أو يخلـب داخل غلاف الخلية Cell Sheaths .

وسيكون الحديث تفصيلاً عن المجموعة الأولى التى 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 :

$$4\,FeCO_3 + O_2 + 6\,H_2O \longrightarrow 4\,Fe(OH)_3 + 4\,CO_2$$

$$\Delta F = -40\ Kcal\ /\ mole$$

ومثـل باقـى Chemolithotrophs فـإن مشـكلـة تـكويـن ATP والقـوة المختـزلة $NAD(P)H_2$ تظل قائمة . وتعـلل 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 :

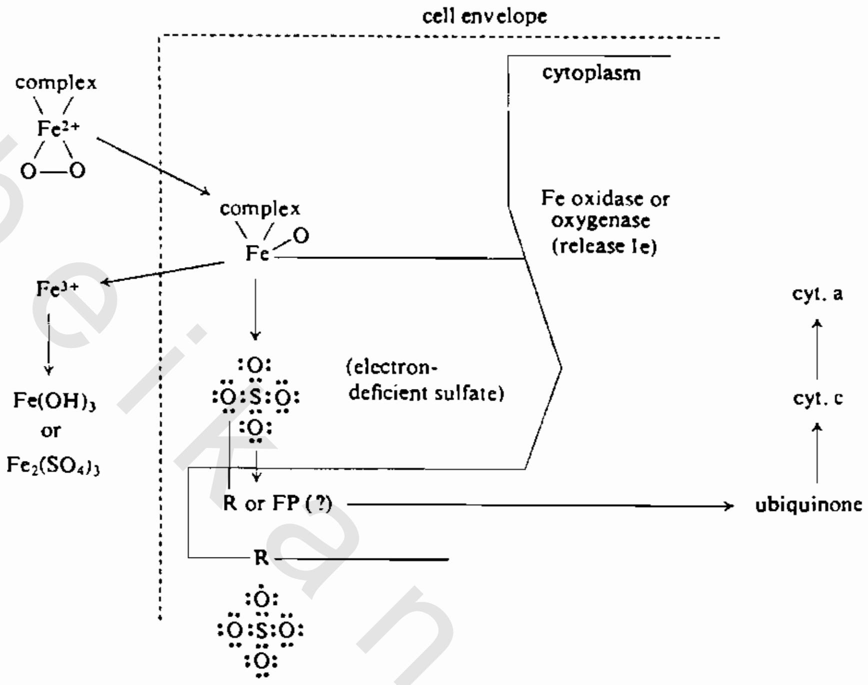
$$Em\ of\ Fe^{2+} / Fe^{3+} = 770\ mV$$

وهذا الجهد ينقص عندما يرتبط الحديـد مع انيون مثلاً الاكسالات حيث جهد اكسالات الحديد يصـل تقريباً إلى الصـفر عند pH حوالـى 7 . . وممكن أن يـكون التفـاعل الانزيمى للسيتوكروم C مع ايون الحديدوز تفـاعل منتج للطاقة كمـا هو الحال مع انزيم iron-Cyt.C reductase (EC 1.9.99.1) الذى له القـدرة على نقل الالكـترون من ايون الحديدوز إلى سيتوكروم C .

- ويصـاحب أكسـدة الحديدوز إلـى الحديديـك تكويـن حمض الـذى هو عادة حـمض الكبريـتيك . ولذا عند وضـع أى تصور لأكسدة الحديـد فلابد أن يوضع فى الاعـتبار

obeikandi.com

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



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 فى هذا المعقد oxygenated وليس oxidized حيث لم يحدث انتقال للالكترون . وهذا المعقد يتكون اما فى المحلول أو على سطح الخلية حيث يتفاعل مع Fe - oxi- (oxygenase) dase وينطلق الكترون الذى ينتقل إلى الخلية عبر السلفات أو الفلافوبروتين (FP) ثم عبر ubiquinone إلى Cyt. C ومنه لـ Cyt. a وأخيراً إلى الاكسجين كمستقبل نهائى . بينما يتأكسد الحديدوز إلى الحديديك وينطلق فى صورة ايدروكسيد أو كبريتات الحديديك ويعتقد أن خطوة انتقال الالكترون إلى Cyt. C يقابلها خطوة فسفرة كما فى اجناس *Nitrobacter* ، *Nitrosomonas* .

- وتتكون القوة المختزلة $NAD (P) H_2$ فى خطوة انسياب الكترونى عكسى لأنه لا يمكن تكون معقد حديد ذو جهد أكبر من (Em - 320 mV) لنظام $NAD^+ / NADH.H^+$. وهذا يعنى وجود نفس سلسلة انتقال الالكترون 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 اختيارى . 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 يعّدل نظام انتقال الالكترون حيث تستطيع الالكترونات 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 فوسفو انيول 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 هتيروتروفيا .

ميكروب *Thiobacillus ferroxidans*

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

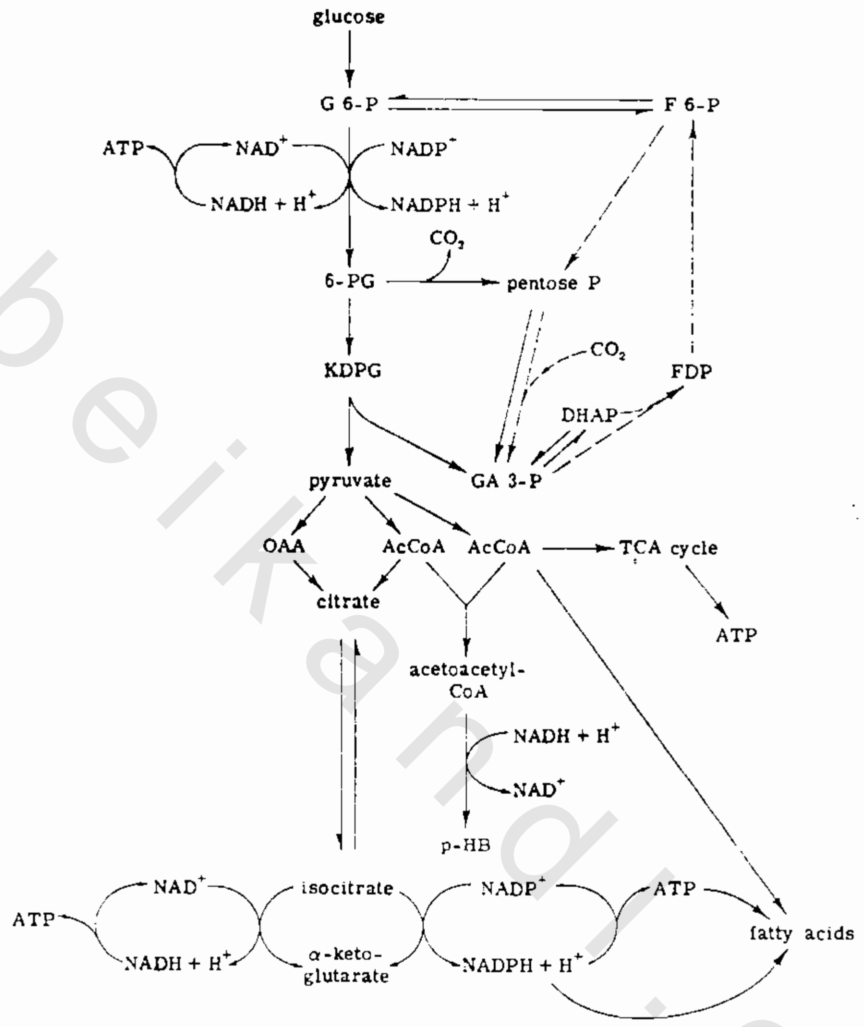
Obeikandi.com

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 الايدروچين وتستطيع النمو mixotrophically .

وفى تجربة باستخدام جلوكوز $[C^{14}]$ وجد أن انزيمات دورة ED يزداد نشاطها إذا نمى *Thiobacillus ferrooxidans* على بيئة تحتوى الحديد والجلوكوز أو الجلوكوز فقط . والخلايا النامية تحت ظروف هيتيروتروفيه 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 Fructsose 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 (٦-٧) : النمو الاتوتروفى (---) والنمو الهتيروتروفى (_____)

والتحولات الايضية فى ميكروب *Thicbacillus ferrooxidans*

نقلاً 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 الآتى :

- وجود تفاعل Transketolase - Transaldolase 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 الايدروچين .. ولم يعرف بعد هل لذلك دخل فى وجود كلا الدورتين (ED , HMP) فى *Thiob. ferrooxidans* بينما دورة ED فقط فى بكتريا الايدروچين .
- ميكانيكية تنظيم regulatory mechanism للنمو الاتوتروفى أو الهتيرتروفى لم تكتشف بعد وربما يلعب glucose 6 - DH ، iso citrate DH دوراً هاماً فى ذلك.
- انتقال الالكترون تحت الظروف الهتيرتروفية بسيط جداً :

$$NAD \longrightarrow Cyt.\ C \longrightarrow Cyt.\ a \longrightarrow O_2$$

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 البولمر فى وجود ايونات المنجنيز والماغنسيوم 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 أ٢ اوتوتروفيا من خلال دورة الريبلوز بيوفوسفات وامتلاكه لانزيم Ribulose biphosphcte carboxylase ولذا وضع في مجموعة Lithotrophic bacteria .

٥٠٦ بكتريا اكسدة الكبريت Sulfer - Oxidizing bacteria

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

$$\left.\begin{matrix} H_2S \\ S^o \\ S_2O_3^= \\ S_4O_6^= \end{matrix}\right\} \xrightarrow{O_2} SO_4^=$$

- 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.*

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

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

obeikandl.com

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

ولعمل تصور عام للتحولات الايضية لهذه الميكروبات توجد عقبتين :

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

ب - مشكلة النفاذيه كما نوقشت فى بكتريا الحديد .

وبالنسبة للعقبة الأولى فقد قسمت إلى أربع طرق :

(١) أكسدة الثيوسلفات إلى التراثيونات والتى تتأكسد إلى الكبريتات كما فى *T. thiooxidans* :

$$6\ Na_2S_2O_3 + 5O_2 \longrightarrow 4\ Na_2SO_4 + 2\ Na_2S_4O_6$$

$$2\ Na_2S_4O_6 + H_2O + O_2 \longrightarrow 2\ Na_2SO_4 + 6\ H_2SO_4$$

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

$$5\ Na_2S_2O_3 + H_2O + 4O_2 \longrightarrow 5\ Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\ S$$

$$2\ S + 3\ O_2 + 2\ H_2O \longrightarrow 2\ H_2SO_4$$

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

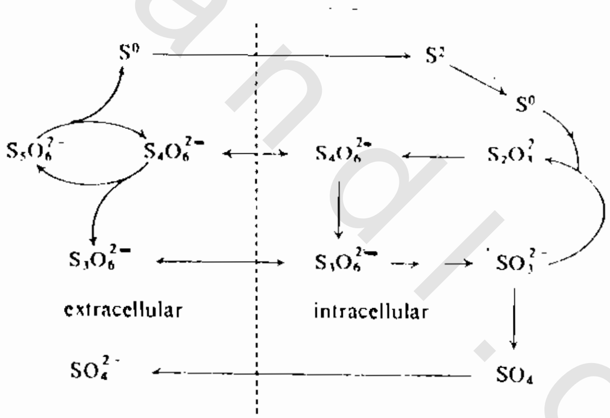
$$Na_2S_2O_3 + 2\ O_2 + H_2O \longrightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$$

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

$$2\,Na_2S_2O_3 + H_2O + \frac{1}{2}\,O_2 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2\,NaOH$$

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

وعموماً يمكن وضع تـصور عام لطريقة انتقال مركبـات الكبريت فى Thiobacilli كما يلى :



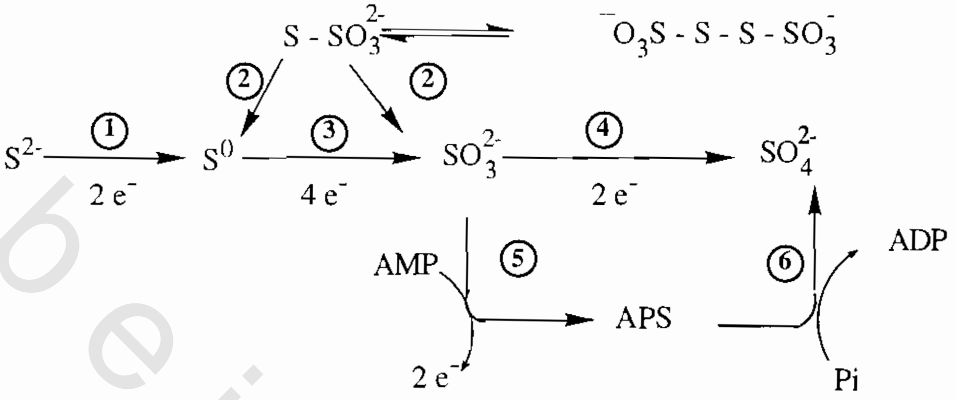
شكل (٦-٨) : انتقال وأكسدة مركبات الكبريت بواسطة Thiobacilli

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

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

openkandi.com

 # 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 الجلوتائيون الذى يؤكسد السلفيد إلى الكبريت المعدنى .

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

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

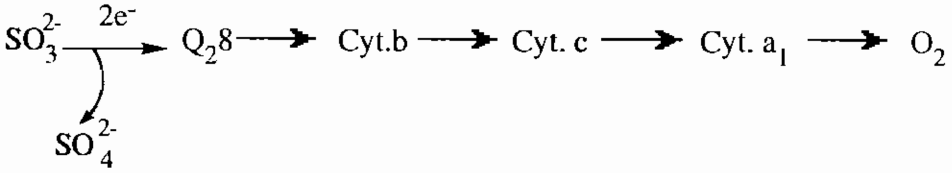
(٤) Sulphite oxidase (EC 1.8.3.1) الذى يؤكسد السلفيت إلى السلفات .

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

(٦) Sulfate adenylyl transferase (EC 2.7.7.5) أو يطلق عليه ADP-Sulphurylase وهو يلامس 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 .

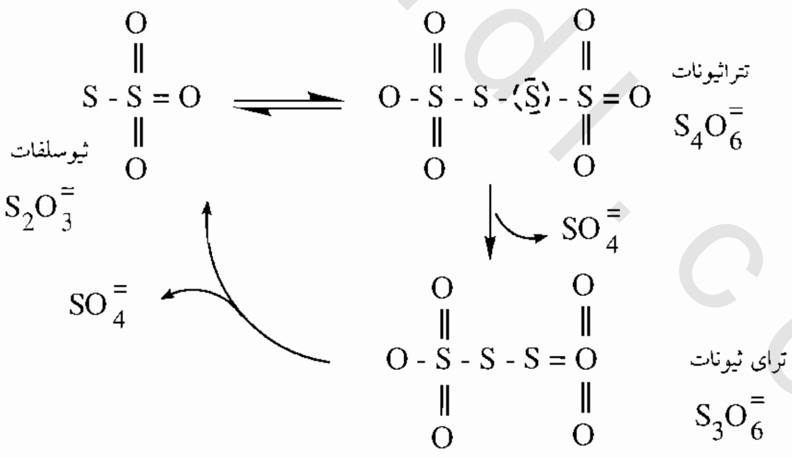
obeikandi.com



وتتلازم خطوة الأكسدة المباشرة هذه مع عمليـة فسفرة مؤكسدة حيث تدخل الالكترونات عند مستوى الفلافين أو الكينون كما سيلى شرحه . (ص٢٦٢)

وبعض Thiobacilli مثل *T. denitrificans* ، *T. thioparns* يمكنها استخدام الطاقة الناتجة من أكسدة السلفيت إلى السلفات بطريقة الفسفرة عند مستوى مادة التفاعل 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 التراثيونات tetrathionate والتى تتأكسد بالتالى إلى trithionate ثم فى النهاية إلى thiosalfate منتجه ٢ مول سلفات أثناء الدورة الحلقية كما بالرسم التالى :

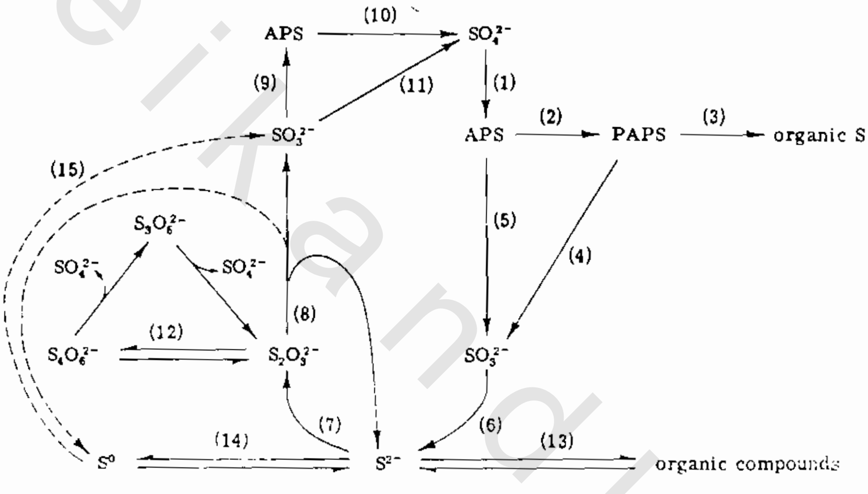


شكل (٦-١٠) الدورة الحلقية لاكسدة الثيوسلفات

obeikandl.com

والتـتراثيونـات لا تعمـل كمادة تفـاعل Substrate لتكـوين ATP إلا فـى وجـود الجلوتـاثيون حيـث تتأكسد سـريعاً بطريـقة غير انـزيمية إلى الثـيوسلفـات . وأكسدة التتراثيونات تثبط عند ١٠ ٪ أكسجين بينما تنشط تحولاتها تحت الظروف اللاهوائية .

فـإذا ربطـنا بـــين كـل تفـاعلات دورة الكـبـريت فـى الـطبيـعة مـتضمـنا dissimilatory redcution فى(*Desulfovibrio*) ، assimilatory reduction فى (النبات ، الثدييات) ، Sulfer oxidation (Thiobacilli) ، فإن الدورة تبدو كما بالرسم التالى :

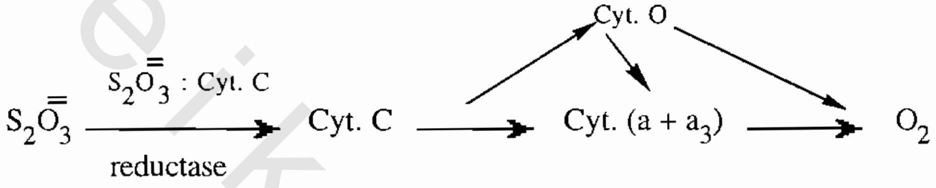


شكل (٦-١١) : تفاعلات أكسدة واختزال المركبات الكبريتية فى الطبيعة
نقلاً عن Doelle سنة ١٩٧٥

ومن الرسم : فإن تـفاعلات (١) ، (٥) ، (٦) تـستعمل بواسـطة ميكروبـات اختزال الكبريت الهدمى dissimilatory ، تفاعلات (٢) ، (٣) (٤) تـستعمل بواسطـة مختزلات الكبريت الـنبائى assimitltory ، الـتفـاعلات مـن (٧) إلـى (١٢) وكـذا (٤) بـواسطـة Thiobacilli وتفاعل (١٣) بواسطة أغلب الميكروبات . ولقد ذكرت الانزيمات التى تلامس هذه التفاعلات بأرقامها الكودية كل فى موضعه سابقاً .

● عمـلية تمثـيل ك أ٢ اوتوتروفـيا بـواسطـــة Thiobacilli تحتـاج لــقــوة مخـــتزلة (NAD (P) H_2) بالإضافة إلى ATP . حيث يرتبط نظام أكسدة الثيوسلفات (انتقال الثيوسلفات عبر الغشاء الخلوى وما يتـبعه من أكسدة) مع انتقال الالكترونات . وانزيم تنشيط الثيـوسلفات يسمى $S_2O_3^{2-}$: Cyt. C reductase وهو لا يدخـل فى عملـية الفسفرة المؤكسدة .

وكما يتضح فإن انتقال الالكترونـات إلى جزئ الاكسجين يمر خلال سيتوكرومات c ، o ، a ، a_3 وهذا يقابله تكوين ATP وتصل p/O ratio إلى 1.0 .



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

$$(S^{2-} + HS^{+} + H_2S) + 3\ H_2O + 3\ NAD\ (P) \longrightarrow SO_3^{2-} + 3\ NAD\ (P)\ H + 5H^{+}$$

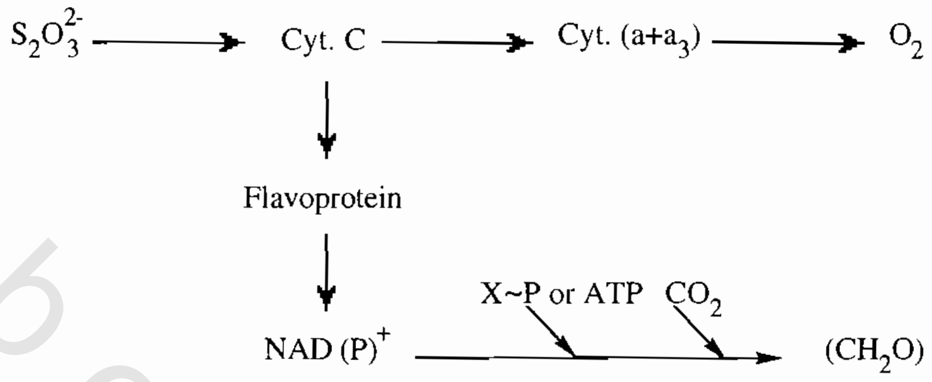
$$\Delta F = +\ 186\ Kcal/mole$$

$$SO_3^{2-} + H_2O + NAD\ (P) \longrightarrow SO_4^{2-} + NAD\ (P)H.\ H^{+}$$

$$\Delta F = +\ 3.7\ Kcal/mole$$

لذا طريقة تـكوين القوة الاختزالة اللازمة لـتثبيت ك أ٢ يتم بواسطة انسـياب الكترونى عكـسى Reverse ATP- driven election transport حـيث تتجـه الالكترونات مـن Cyt. C إلى الفلافوبروتين بدلا من الاكسجين كما هو بالرسم التالى :

obeikandi.com



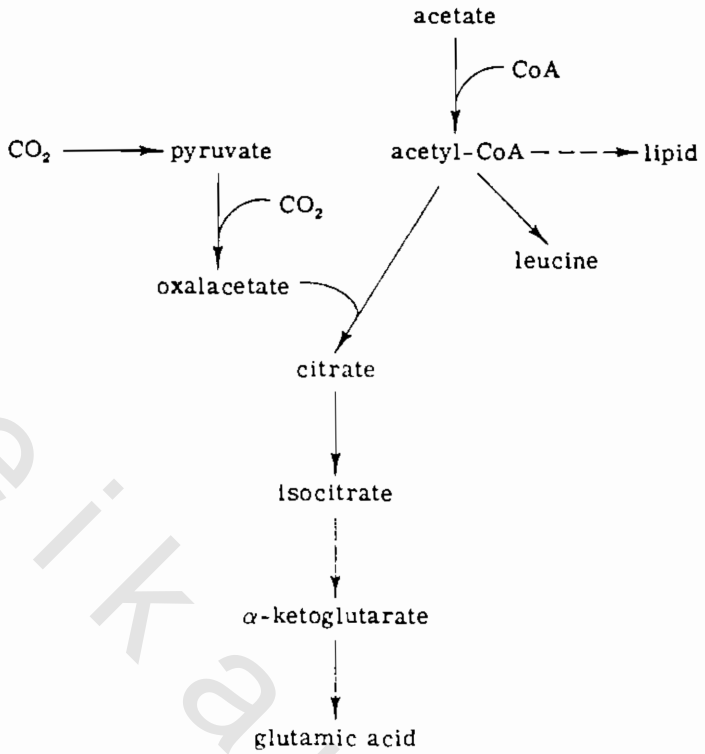
شكل (٦-١٢) : نظام انتقال الالكترونات فى Thiobacilli

ودخول الالكترونات يتم عند مستوى الفلافين مما يقّصر 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 كربوكسيليز الخاص بدورة كالفن وتثبيت ك أ٢ اوتوتروفيا فى وجود هذه المواد العضوية .
وتمثيل 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 أ٢ فى تكوين البروتين أو لتخليق البرولين والارجنين من الجلوتامات وكذا الادينين والجوانين من الجليسين وتشبه ميكانيكية التخليق الحيوى فى هذا الكائن تقريباً الكائنات الهيتروتروفيه مع الاحتياج للطاقة الاوتوتروفية .
وأشهر مثال على ذلك تنشيط الأسبتات إلى اسيتيل كوانزيم A واستخدامها كمصدر رئيسى لتخليق الليبيدات والأحماض الامينية ثم تكثيف acetyl CoA مع الاكسالواستيات (المتكونة من تثبيت ك أ٢) لتكوين السترات كما بالرسم التالى :

obeikandi.com



شكل (٦-١٣) : تحولات الاسيتات بواسطة الاتوتروفى الحتمى *T. neapolitanus*

- وبعض أفراد thiobacilli الـ mixotroph مثل *T. novellus* يستطيع النمو تحت ظروف هتيرتروفية كاملة ولا تحتاج إلى الطاقة الاتوتروفية . ويبدو وجود تغيرات جوهرية فى بناء الغشاء السيتوبلازمى وكذا امتلاك الميكروب لكل انزيمات دورة TCA ودورة glyoxylate . كما يمتلك انزيم glutamate dehydrogenase. المرتبط بالمرافقات الانزيمية $NADP^+$ ، NAD^+ والذى يلعب دوراً تنظيمياً فى تخليق الجلوتامات بالذات حيث ينظم AMP (الذى يتكون أثناء عمليات التخليق الحيوى) التوازن بين بناء وهدم الجلوتامات . ويستطيع ميكروب *T. novellus* استعادة قدرته على النمو الاتوتروفى بمجرد توافر ك أ٢ وبعض الأحماض العضوية فى البيئة مع الثيوسلفات .

- وعملية تنظيم النمو الاتوتروفى والهيتروفى تتم عند مستوى glucose 6-P dehydrogenase ، isocitrate DH ، ∝ keto glutarate DH المرتبطة بـ NAD (P) حيث **تحت الظروف الاتوتروفية** يكون أكسدة الثيوسلفات فى أقصى معدلاتها بينما يقل نشاط انزيمات هدم الجلوكوز **بينما تحت الظروف الـ mixotroph** يقلل

وجود المواد العـضوية من الطاقة اللازمـة للنمو ويثبط نـظام أكسدة الثيوسلـفات وتحفز انزيمات هدم الجلوكوز . **وفى الظروف الهيترتروفية** وغياب الثيوسلفات فإن دورتى TCA ، ED تصـبحان فى أقـصى معدلاتـهما . والـتحكم فـى انزيم G-6P DH (بواسطة ATP الذى يثبط هذا الانزيم) هو الذى يحدد الدورة المستخدمة وتشبه فى ذلك بكتريا الايدروجين .

- ونظام تكوين الطاقة فى thiobacilli الهيتروتروفية غير واضـح للآن ويبدو أنها تمتلك نظام الانسيـاب الالكترونى العكسى . وفـى هذه الحالة فإن أكسدة الأحمـاض العضوية تنتج مكونات وسطية بالخـلية عالية الطاقة مثل ATP أو مشتقاتها (X~) التى تعكس الانسياب الالـكترونى العادى فى الـسلسلة التـنفسية بحيـث تختزل NAD^+ بواسـطة Cyt. C كما فى بقية الاتوتروفيات .

$$\text{Succinate} + \text{FP} \longrightarrow \text{Fumarate} + \text{FPH.H}^+$$

$$\text{FPH.H}^+ + 2\ \text{Cyt. CFe}^{3+} + (\text{X}) \longrightarrow (\sim\text{X}) + \text{FP} + 2\ \text{Cyt. CFe}^{2+} + 2\ \text{H}^+$$

$$(\sim\text{X}) + 2\ \text{Cyt. CFe}^{2+} + \text{NAD}^+ + 2\ \text{H}^+ \longrightarrow (\text{X}) + 2\ \text{Cyt. CFe}^{3+} + \text{NADH.H}^+$$

ويمكن تلخيص المعادلات السابقة فى الصورة التالية :

$$(\text{Succinate} \xrightarrow{2\text{H}^+} \text{FP} \longrightarrow \text{Cyt. C Fe}^{3+} \longrightarrow \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{NADH}_2)$$

أو أن يتأكسد Cyt. C مباشرة بواسطـة جزئ الاكسـجين مع إنتاج مركب غـنى الطاقة (X~) .

$$2\ \text{Cyt. CFe}^{2+} + 2\ \text{H}^+ + \frac{1}{2}\ \text{O}_2 + (\text{X}) \longrightarrow 2\ \text{Cyt. CFe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + (\sim\text{X})$$

وهذا المركب الـغنى بالطاقـة يتكون عند مسـتوى السبتوكـروم اكسيديز الطـرفى ويمكن استخدامه فى انتقال الالكترون العكسى لاختزال $NAD(P)^+$.

٦٠٦ الفرق بين الميكروبات الاتوتروفية والهتيرتروفية

سبق تعريـف الميكروبات الاتوتروفيـة بأنها التى تستـطيع الحصول على طاقـتها اما من الضوء (الفوتوتروفية) أو أكسـدة المواد الغير عضوية (Clemolithotroph) واستخدام ك أ٢ كمصدر كربون وحيد وتمـثيله إلى مادة الخلية من خلال دورة كالفن (الريـبولوز بيوفوسفات) ولكن وجد أن عدد ليس بالقليل من ميكروبات المجموعة السابقة يستطيع النمو تحت الظروف الهتيروتروفيـة فيما يسمى border line cases . وثبت أن التـركيب الخلوى متـشابه فى الاتوتروفية والـهتيرتروفية وان كليـهما يملكان نفس الانزيمـات ويحتاجان نفس الفيـتامينات والمرافقات الانزيميـة بل يملكان نظام الفسفـرة لتكوين ATP مع تميز الاتوتروفيـة بامتلاكها بعض الانزيمات الإضافيـة لتمكينها من أكسدة الأملاح الغـير عضوية واختزال ك أ٢ لتخليق مادة الخلية .

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

حاول Kelly سـنة ١٩٦٧ وضـع تعريـف يتضـمن ٦ نـقاط (مـنفردة أو مـجتمـعة) للميكروبات الاتوتروفية .

(١) نقاذيتها المحدودة للمواد العضوية .

(٢) عدم مقدرتها على أكسـدة المواد العضوية للحصول على الطاقة أى حـتى فى حالة نفاذية بعض المواد الـعضوية خلال الغشـاء فإن الميكروب لا يستطيع الحصول علـى طاقة من أكسدتها .

(٣) عدم مقدرتها على تخليق مادة الخلية العضوية من أى مصدر كربونى خلاف ك أ٢ الذى يُمثّل من خلال دورة كـالفن . وقد عدل هذا البنـد أخيراً بقدرة الميكروب عـلى امتلاك انزيم ريبولوز ١ر٥ بيوفوسفات كربوكسيليز (مفتاح دورة كالفن) .

(٤) يُثّبـط أو يُـوقَف نموهـا فى وجـود مواد عضويـة خارجية مـثل إضافة الجـلوكوز - الاسيتات . . . إلخ .

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

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

ورغم ذلك فلابد من مزيد من الدراسات على الميكانيكيات المنظمة لعملية تثبيت ك أ٢ . ولتجاوز هذه المشكلة وإيجاد Terminology محدد قام Peck سنة ١٩٦٨ بتقسيم الميكروبات الكيموتروفيه إلى ٣ مجاميع :

(أ) obligate autotroph وهى التى تحصل على طاقتها فقط من أكسدة المواد الغير عضوية ولا تستطيع تمثيل المواد العضوية البسيطة مثل الاستيات بنفس طريقة ك أ٢ ومثالها *Thiobacillus thiooxidans* ، *Nitrosomonas europeae* .

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

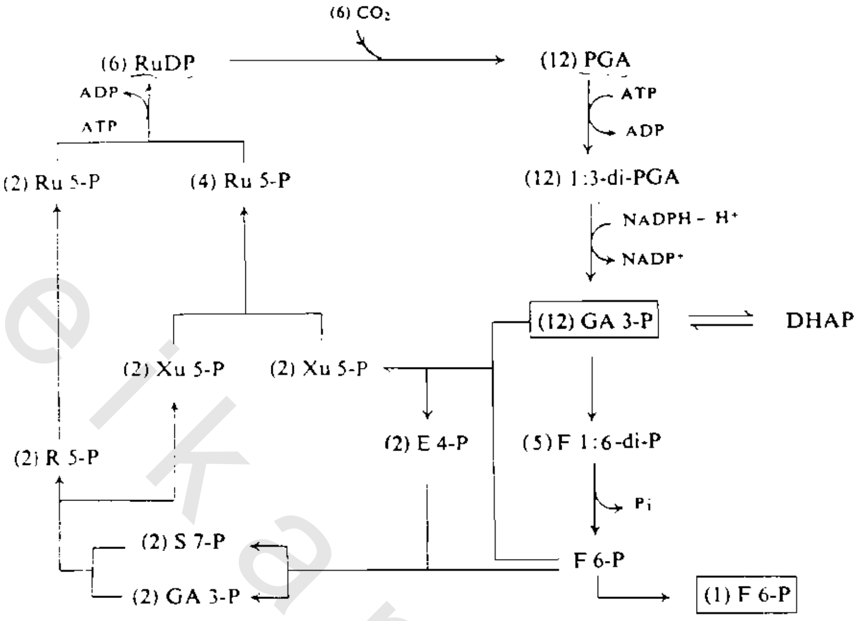
(جـ) Assimilatory autotroph التى تحصل على طاقتها فقط من أكسدة المواد الغير عضوية ولكنها تستطيع إدخال المواد العضوية خلال الغشاء الخلوى وتستخدمها فى التخليق الحيوى لمكوناتها ومثالها *Dosulfovibrio* .

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

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

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

٦-٧ تثبيت ك أ٢ من خلال دورة كالفن



شكل (٦-١٤) : تصور عام لدورة كالفن (الريبولوز بيوفوسفات)

ومحصلة هذه الدورة هو :

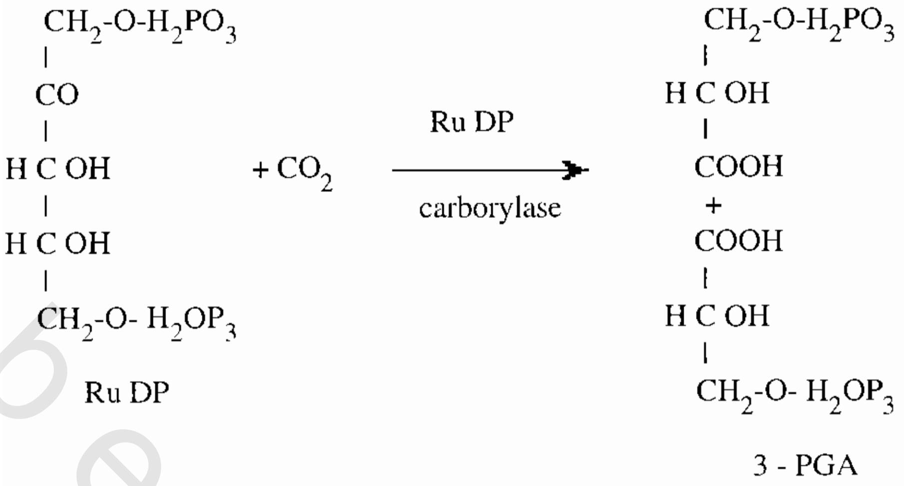
$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ (NADPH.H^+) \longrightarrow$$

$$1\ Fructose\ 6\text{-}P + 18\ ATP + 12\ NADP^+$$

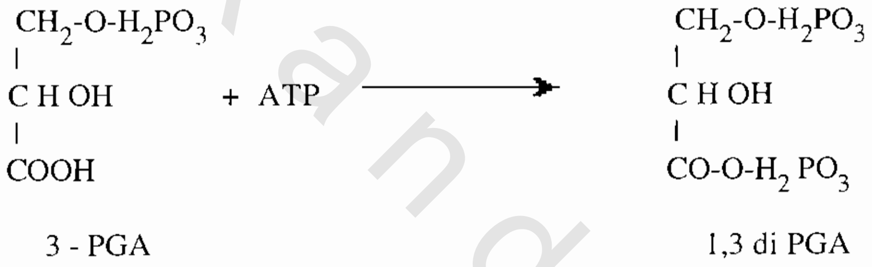
وتفصيلاتها كالتالى :

(١) يتحد ك أ٢ مع الريبلوز ١ر٥ داى فوسفات (Ru DP) فى وجود انزيم ريبولوز داى فوسفات كربوكسيليز (EC 4.1.1.39) وهو يعتبر مفتاح (key) هذه الدورة ويتكون ٢ مول من ٣ - فوسفو جليسرات (3-PGA) .

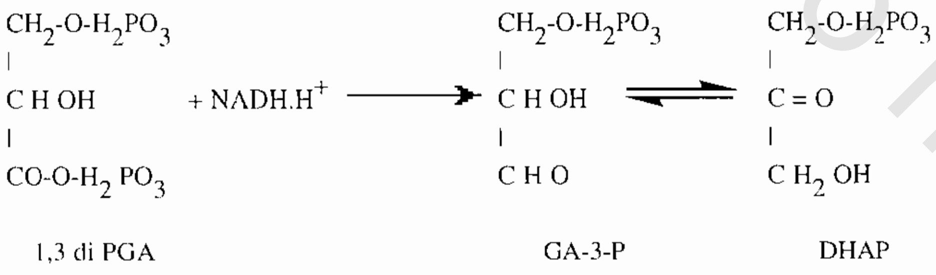
obeikandi.com



(٢) يتحول ٣ - فوسفو جليسرات إلى ١ر٣ دى فوسفو جليسرات (1.3 di PGA) فى وجود انزيم فوسفو جليسرات كينيز (EC 2.7.2.3) وهى خطوة فسفرة تحتاج لطاقة .

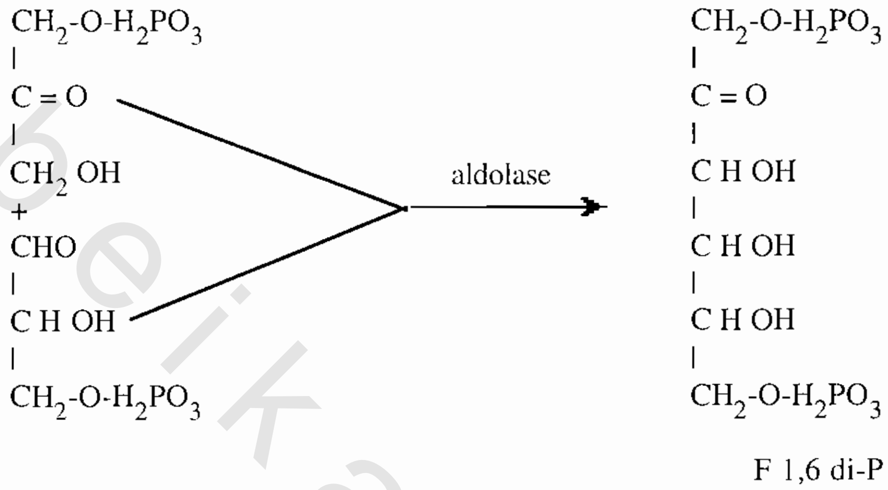


(٣) أكسدة مفسفرة ثانية فى وجود انزيم NADP-linked dehydrogenase (EC 1.2.1.13) لتكوين جليسرلدهيد ٣ - فوسفات (GA-3-P) . والمركب الأخير يوجد فى حالة تـوازن مع دى هيدروكـس اسيتـون فوسفات (DHAP) بمساعدة انـزيم triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) .

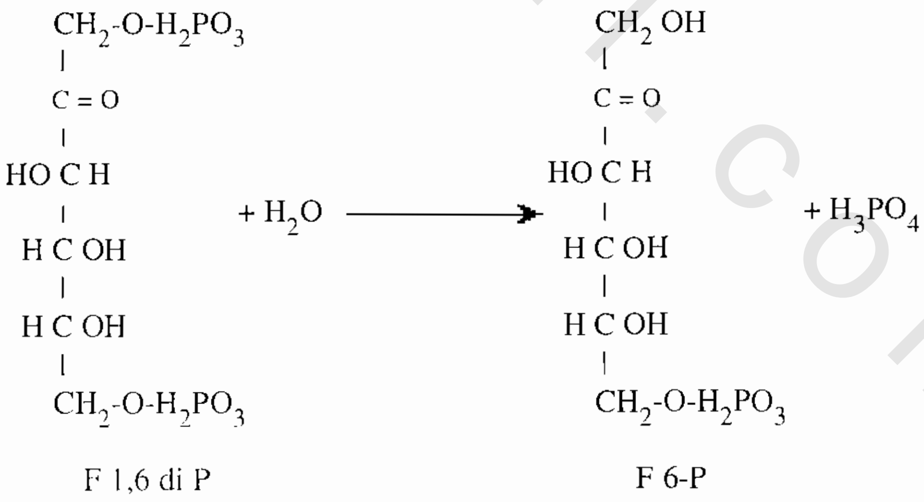


obeikandi.com

(٤) ربط المركبين ذوى الثلاث ذرات كربون السابقين بواسطة انزيم Fructose diphosphale aldalase (EC 4.1.2.13) لتكوين فركتوز ١ر٦ دى فوفسفات .



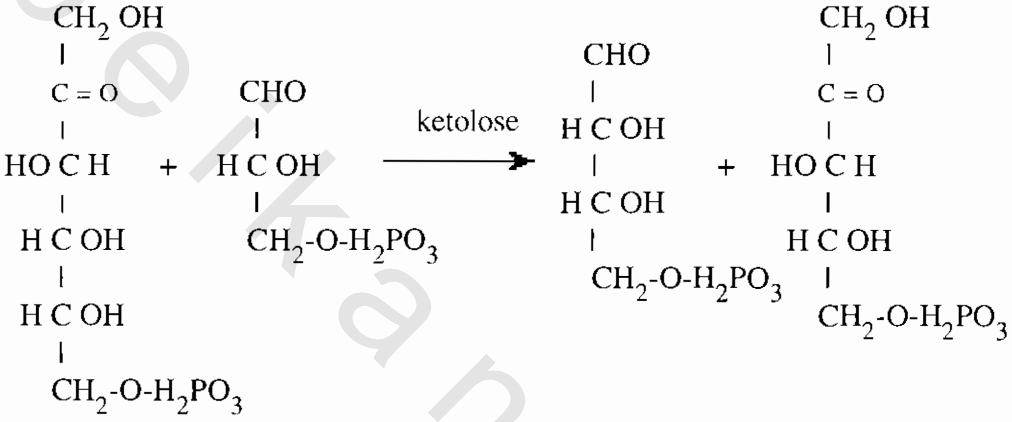
(٥) تحويل فركتوز ١ر٦ دى فوسفات إلى فركتوز ٦- فوسفات بنزع مجموعة فوسفات dephosphorylation وذلك فى وجود انزيم Hexose diphosphatase (EC 3.1.3.11) .



obeikandi.com

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 داى 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) .

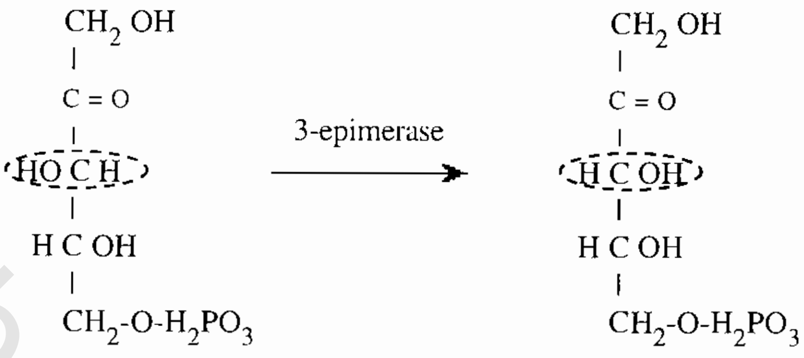


(F 6-P) (GA 3-P) (E 4-P) (Xu 5-P)

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

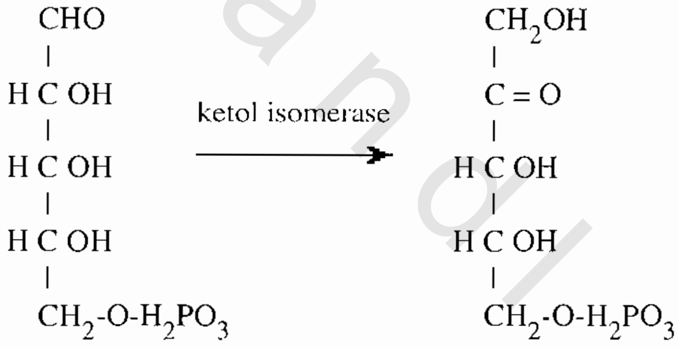
(٨) يتحول الزيليلوز ٥ - فوسفات إلى الريبولوز ٥ - فوسفات (Ru 5-P) فى وجود Ru 5-p 3-epimerase (EC 5.1.3.1) .

opekandi.com



(Xu 5-P) (Ru 5-P)

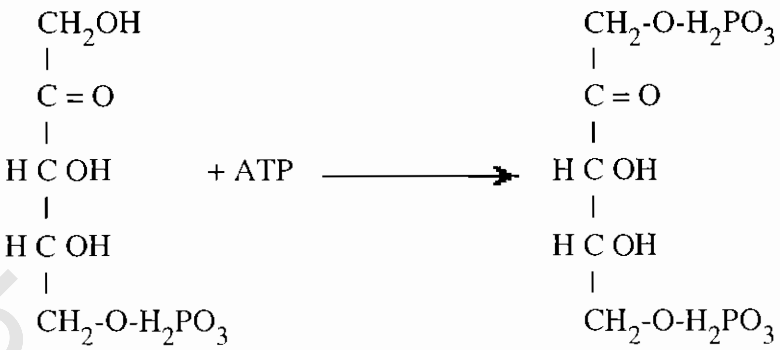
بينما يتحول الريبوز ٥- فوسفات (R 5-P) إلــى ريبولوز ٥- فوسفات (Ru 5-P) في وجود انزيم R-5-P ketol isomerase (EC 5.3.1.6) .



R 5-P Ru 5-P

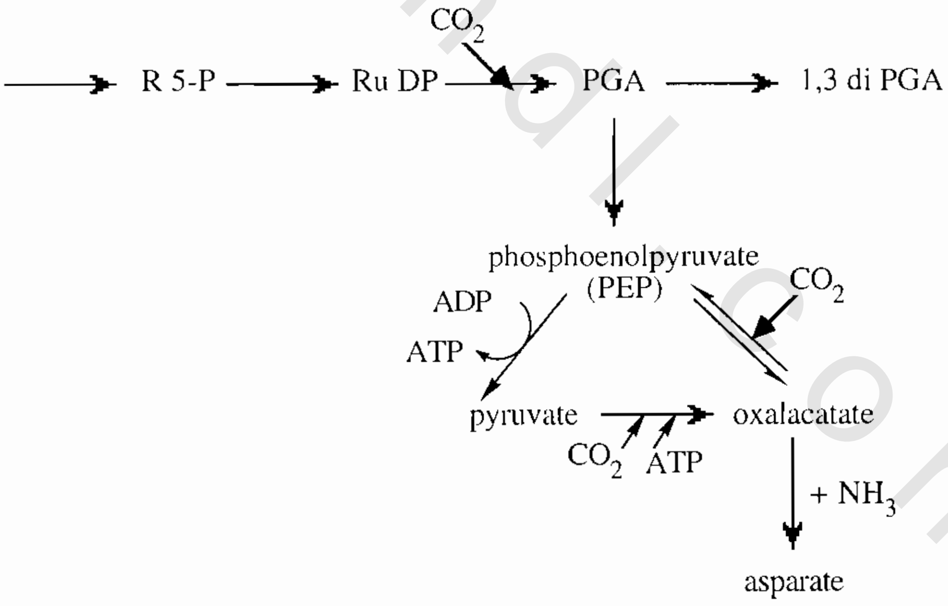
(٩) الانــزيم الثانـــي الـــذى يميز دورة كالفــن ويغلق الـــدورة الحلقية هـــو phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19) وهـــو يفسفر الريبولـوز ٥- فوسفات إلـــى ريبولوز ١ر٥ داى فوسفات (Ru DP) الذى هو مفتاح الدورة والذى سميت باسمه .

obeikandl.com



Ru 5-P   Ru 1,5 di-P

ويقاس حدوث أو غياب تثبيت ك أ٢ بواسطة دورة كالفن بتقدير نشاط انزيم ريبولوز دى فوسفات كربوكسيليز والذى عرف فى المراجع القديمة باسم Carboxy dismutase ومع ذلك فإنه ليس كل الميكروبات الاتوتروفية تستطيع القيام بدورة كالفن كما وصفت سابقاً فهناك بعض الميكروبات القليلة مثل *Chromatium* تتبع ميكانيكية أخرى قريبة منها تعتمد على احتياجها إلى خطوتين لتثبيت ك أ٢ بدلاً من واحدة .



شكل (٦-١٥) : دورة تثبيت ك أ٢ المضاعفة فى *Chromatium*

obeikandl.com

ففى هذا الميكروب ثبت أن حمض الاسبارتيك من النواتج الثابتة لعملية تثبيت ك أ٢ وان ذلك يرجع إلى خطوة إضافة ك أ٢ 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 الاسبارات . ولهذا افترض أن *Chromatium* يستعمل دوره «تثبيت ك أ٢ مضاعفة» كوسيلة سريعة لإدخال الكربون فى الأحماض العضوية ثم الامينية لتخليق مادة الخلية .

obeikandl.com

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 الوسطية وتعاقب سلسلة التفاعل .

٣ - «خطوة أكسدة الهيدروكسيل منتجه للطاقة exergonic مما يدل على ارتباطها بنظام السلسلة التنفسية» وضح ذلك .

٤ - اشرح كيف تستطيع بكتريا التأزت (أو الكيموتروفية عموماً) الحصول على طاقتها (ATP) ، تكوين القوة المختزلة ($NADH.H^+$) اللازمة لتثبيت ك أ٢ برغم أن جهد الأكسدة والاختزال لمواد تفاعلها أقل بكثير من جهد $NAD^+ / NADH_2$ ؟

٥ - اذكر أهم الفروق بين النظام الانزيمى لكل من *Netrosomonas* ، *Nitrobacter* ؟

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 ميكروبى أكسدة الحديد .

Ferrobacilles ferrooxidans & Thiobacillus ferrooxidans

٨ - اشرح السلسلة التنفسية لميكروبات Thiobacilli .

٩ - اشرح المصطلحات التالية :

Obligate Facultative , assimilatcry 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 Sulate reduction ، dissimilatory Sulfate reduction ؟

١٢- اشرح لماذا وضعت الخمس مجاميع بكترية السابقة تحت مسمى aerobic chemo-lithotraphs ومدى انطباق شروط Kelly عليها .

١٣ - ماذا يعنى « دورة تثبيت ك أ٢ المضاعفة » ؟ وأين تلاحظ وما أهميتها ؟

obeikandi.com

المراجع

1. Aleem, M.I.H. and Lee, H. (1963). ATP–dependent reduction of NAD by ferrocytochrome 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. Lees, 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.

obeikandl.com