

Metabolismi Chemiolitotrofi

PROF.STEFANO DUMONTET - DOTT.ROSA ANNA NASTRO

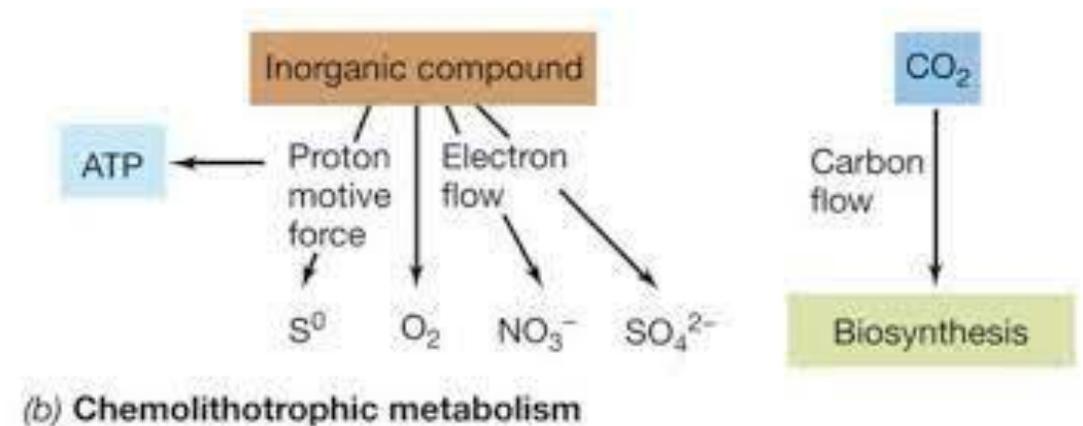
Avvertenza

I MATERIALI PRESENTI IN QUESTE DIAPOSITIVE SONO FRUTTO SIA DEL LAVORO DEL PROF. VINCENZO PASQUALE SIA DI LAVORO PERSONALE BASATO SU RICERCHE EFFETTUATE SUL WEB, SU LIBRI E SU ARTICOLI SCIENTIFICI E DIVULGATIVI. OVE POSSIBILE, SONO STATE RIPORTATE LE FONTI DA CUI SI È DESUNTO IL MATERIALE.

I chemiolitotrofi organicano la CO_2 utilizzando donatori di elettroni inorganici come H_2S , Fe^{2+} o NH_2 nel trasporto di elettroni. L'ATP viene generato mediante fosforilazione ossidativa. Il NADH si forma attraverso reazioni endoergoniche accoppiate al processo di ossidazione dei donatori di elettroni. Tali donatori, a loro volta, si sono formati in seguito alla riduzione di composti inorganici operata da organismi aerobi. In definitiva, l'energia liberata dall'ossidazione di tali composti inorganici ridotti deriva a sua volta dall'ossidazione dell'ossigeno

Il concetto di chemiolitotrofia si è affermato a partire nella seconda parte del XIX secolo quando Sergej Winogradskij pubblicò i suoi studi sui solfobatteri.

Ad oggi, si sa che la chemiolitotrofia dello zolfo è uno dei principali stili di vita metabolici di molti *Archea* e *Bacteria*



Sulphomonas (batteri solfurei): ottengono energia dall'ossidazione dello zolfo elementare o dell'H₂S, ad esempio *Thiobacillus*, *Beggiatoa*.

Batteri ossidanti lo zolfo elementare: batteri solfurei denitrificanti ossidano S⁰ in H₂SO₄ (*Thiobacillus denitrificans*: $2S + 2H_2O + 3O_2 \rightarrow 2H_2SO_4 + 126 \text{ kcal}$).

Batteri ossidanti i solfuri: ossidano H₂S e rilasciano S (*Beggiatoa* $\rightarrow 2H_2S + 4O_2 \rightarrow 2H_2O + 2S$ $\Delta G = -141,8$ kcal).

Hydromonas (batteri H ossidanti): convertono H₂ in H₂O (*Bacillus pantotrophus*, *Hydrogenomonas*: $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$ $\Delta G = -55$ kcal; $4H_2 + CO_2 \rightarrow 2H_2O + CH_4$ $\Delta G = -4,3$ kcal

Ferromonas (batteri del ferro): ottengono energia dall'ossidazione dei composti ferrosi in forme ferriche. (*Thiobacillus ferroxidans*, *Ferrobacillus*, *Leptothrix*: $4FeCO_3 + 6H_2O + O_2 \rightarrow 4Fe(OH)_3 + 4CO_2$ $\Delta G = -81$ kcal).

Batteri metanigeni: ottengono la loro energia dall'ossidazione del CH₄ in H₂O e CO₂ (*Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*: $CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$ $\Delta G = -193,5$ kcal).

Nitrosomonas e Nitrobacter (batteri nitrificanti): ottengono energia dall'ossidazione di NH₄⁺ e NO₂⁻ in NO₃⁻
Nitrosomonas: $NH_3 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O + HNO_2$ $\Delta G = -65,7$ kcal; *Nitrobacter*: $NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^-$ $\Delta G = 15,6$ kcal.

Batteri ossidanti CO: ossidano il CO in CO₂ (*Desulfovibrio desulfuricans*: $2CO + O_2 \rightarrow 2CO_2 + H_2$ oppure $3CO + H_2SO_3 \rightarrow 3CO_2 + H_2S$).

Ossidazione dei composti dello zolfo

Lo zolfo è il decimo elemento più abbondante sulla crosta della terra ed il sesto per abbondanza negli oceani.

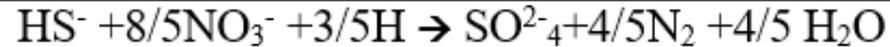
E' uno dei principali elementi che costituiscono gli organismi viventi (circa 1% nei batteri) dove entra nella costituzione di amminoacidi (cistina e metionina), coenzimi, vitamine, ormoni ma anche di antibiotici (pennicillina).

Può presentare diversi stati di ossidazione che vanno da -2 a +6. In natura le forme più importanti sono 3: solfuro (HS^-) e sulfidrilico (R-SH) con stato di ossidazione -2, zolfo elementare con stato di ossidazione pari a 0 e solfato SO_4^{2-} con stato di ossidazione pari a +6.

Ossidazioni HS⁻

I batteri possono ossidare non solo HS⁻, ma anche S⁰ ed S₂O₃²⁻ per generare energia

HS⁻/NO₃⁻



Thiobacillus denitrificans
 $\Delta G_o' = -177.9 \text{ Kcal.}$

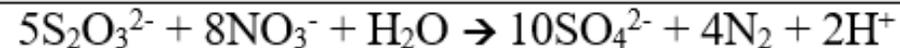
HS⁻/O₂



Thiobacillus, Beggiatoa, Thioploca,
Achromatium, Thiovolum
 $\Delta G_o' = -190.4 \text{ Kcal}$

La biochimica di quest'ossidazione è complessa e coinvolge un composto inusuale l'adenosina 5-fosfosulfonato (APS). È l'unica reazione litotrofica ad avere fosforilazione a livello di substrato.

S₂O₃²⁻/NO₃⁻

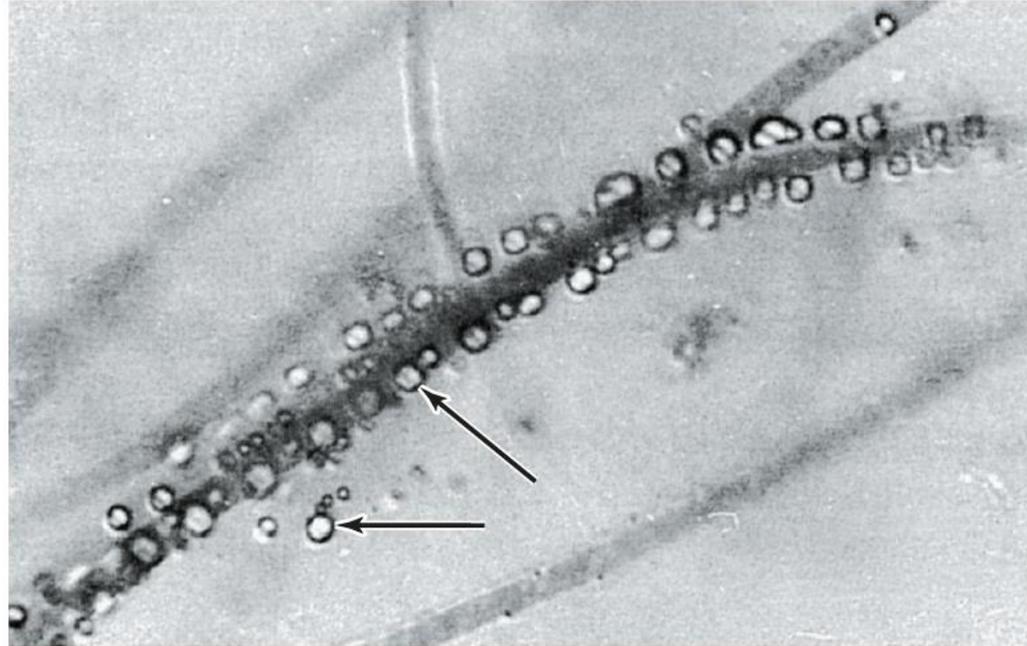


Thiobacillus denitrificans
 $\Delta G_o' = -193 \text{ kcal/mole}$

Tabella 14.2 Confronto tra le energie di ossidazione di alcuni comuni composti solforati ridotti

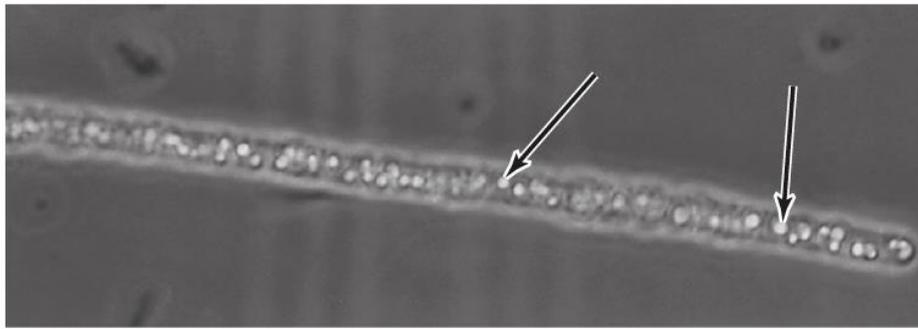
Reazione chemiolitotrofica	Elettroni	Stechiometria ^a	Energetica (kJ/elettroni) ^a
Da solfuro a solfato	8	$\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	$\Delta G^{0'} = -798,2 \text{ kJ/reazione } (-99,75 \text{ kJ/e}^-)$
Da solfito a solfato	2	$\text{SO}_3^{2-} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	$\Delta G^{0'} = -258 \text{ kJ/reazione } (-129 \text{ kJ/e}^-)$
Da tiosolfato a solfato	8	$\text{S}_2\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	$\Delta G^{0'} = -818,3 \text{ kJ/reazione } (-102 \text{ kJ/e}^-)$

^aTutte le reazioni sono bilanciate, dal punto di vista sia atomico sia della valenza. Per ulteriori dettagli e calcoli si vedano la Tabella 3.3 e il Paragrafo 3.3. Per le reazioni e l'energetica dell'ossidazione dei solfuri a zolfo e da zolfo a solfato, si veda la Tabella 14.1.

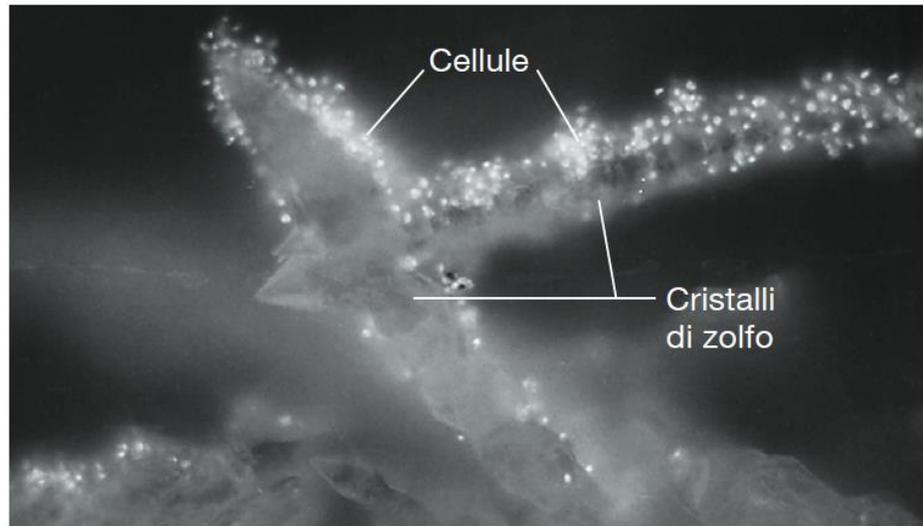


Yehuda Cohen e Moshe Shilo

Figura 14.18 Ossidazione di H_2S da parte di *Oscillatoria limnetica*. Si notino i globuli di S^0 (freccie), il prodotto di ossidazione di H_2S , formati all'esterno delle cellule. *O. limnetica* esegue la fotosintesi ossigenica, ma in presenza di H_2S le cellule ritornano al processo anossigenico.



(a)



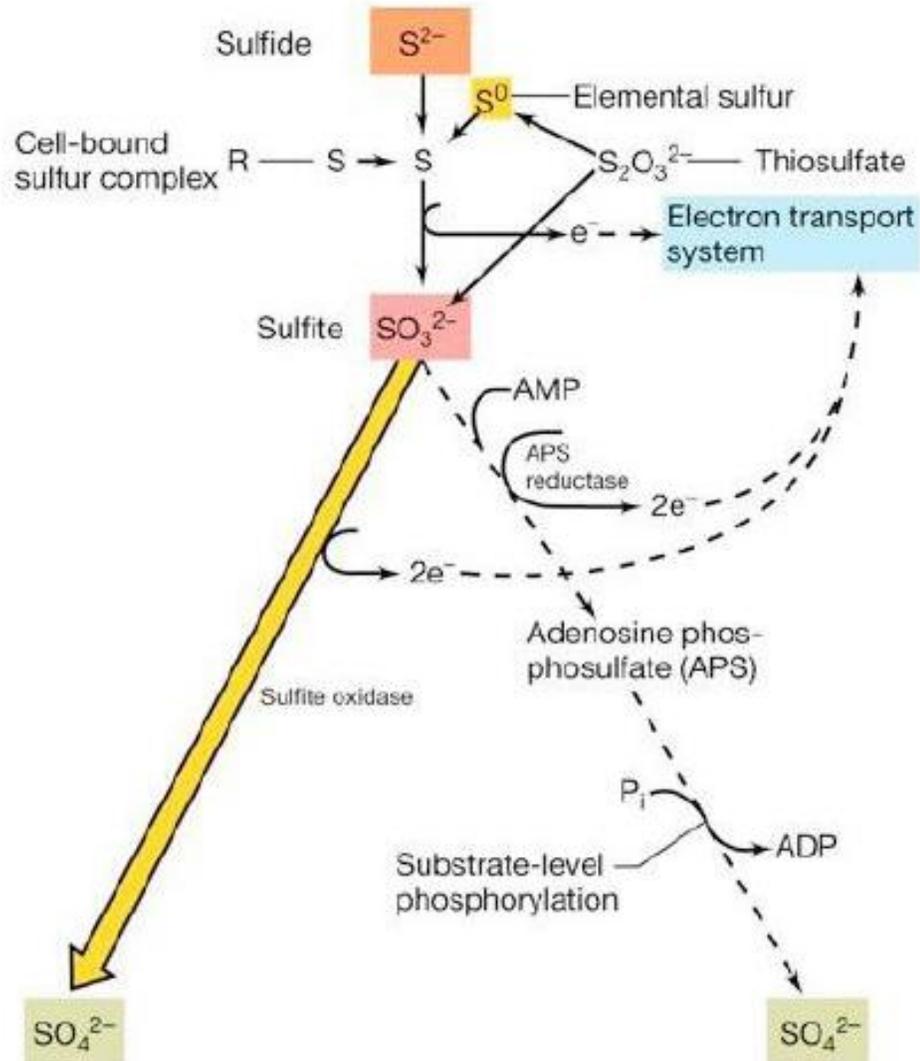
(b)

Figura 14.19 Solfobatteri. (a) Granuli di zolfo intracellulari in *Beggiatoa* (freccie). (b) Adesione di cellule dell'archeobatterio zolfo-ossidante *Sulfolobus acidocaldarius* a un cristallo di zolfo elementale. Le cellule sono state visualizzate mediante microscopia a fluorescenza dopo colorazione con il colorante arancio di acridina. Il cristallo di zolfo non è fluorescente.

Uno dei prodotti dell'ossidazione dei composti ridotti dello zolfo sono i protoni (H^+) con conseguente acidificazione dell'ambiente.



Molti batteri sulfurei sono anche acidofili o acido tolleranti (*Acidithiobacillus thiooxidans* cresce a pH compreso 2 e 3)



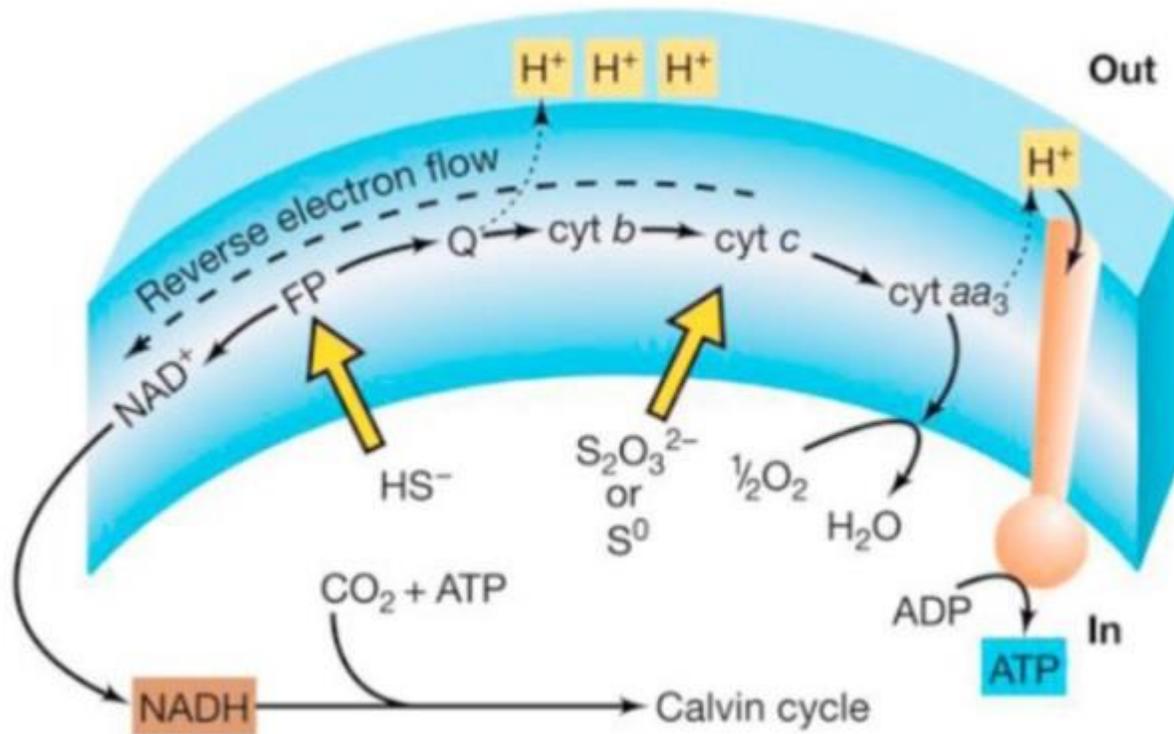
Il sistema Sox (ossidazione del zolfo) è codificato da più di 15 geni codificanti per citocromi e proteine coinvolti nell'ossidazione del zolfo a solfati

Quattro enzimi fondamentali: SoxA (zolfo ossidasi)
SoxXY (proteina trasportatrice), SoxB (solfite ossidasi), SoxCD (zolfo deidrogenasi)

Gli elettroni sono incanalati nella catena di trasporto elettronica mentre i protoni vengono espulsi nell'ambiente circostante

L'ATP è prodotto nel citoplasma per fosforilazione a livello di substrato

In assenza di SoxCD, lo zolfo viene accumulato nel periplasma in granuli



Flusso degli elettroni nelle reazioni di ossidazione batterica chemolitotrofa dei composti ridotti dello zolfo

Gli elettroni per l'organizzazione della CO_2 provengono dalla catena di trasporto inverso degli elettroni che alla fine produce NADH. E' presente il ciclo di Calvin o altre vie autotrofiche

Batteri Solfo-ossidanti

Tre Phyla di Bacteria:

- *Proteobacteria*
- *Aquificae*
- *Deinococcus-Thermus*

Un Phylum di Archea:

- *Crenarcheota*

La maggior parte dei batteri solfo-ossidanti appartiene ai Beta- (*Thiobacillus*), Gamma- (*Achromatium e Beggiatoa*) ed Epsilon –proteobacteria (*Thiovulum e Sulfurimonas*)

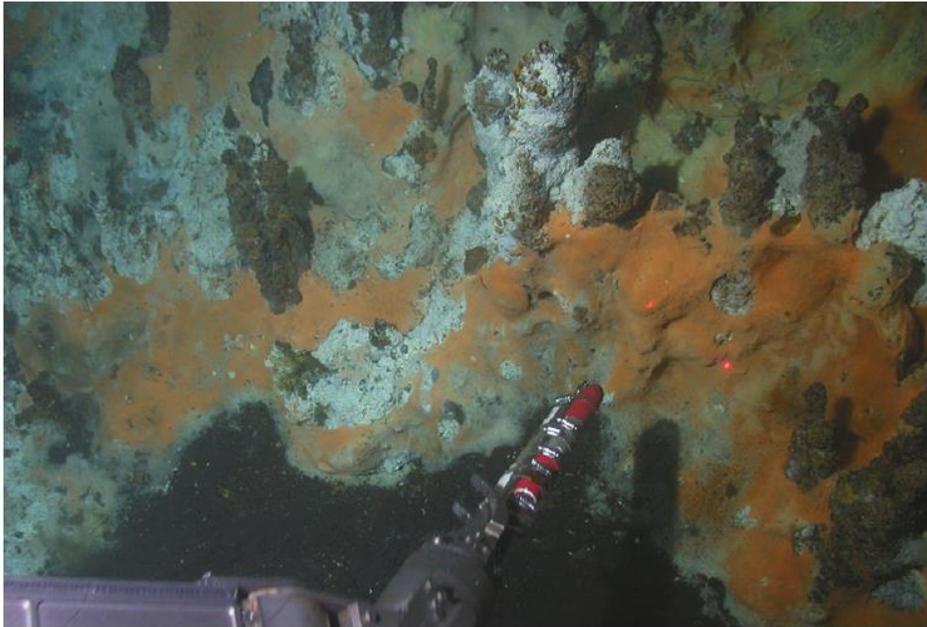
Grandi differenze in termini:

- Dimensioni: <1 μm (*Sulfurimonas denitrificans*) fino a 2 cm (*Thiomargarita magnifica*)
- Accettore di elettroni: O_2 e NO_3 in denitrificanti
- Gradi di ossidazione dello zolfo: formazione di granuli di S° da ossidare in un secondo step metabolico
- Alcuni sono chemiolitotrofi obbligati \rightarrow presenza di carbossisomi contenenti alte concentrazioni di RuBisCO ed anidrasi carbonica
- Alcuni sono chemiolitotrofi facoltativi (utilizzano composti organici come fonte di carbonio) altri sono mixotrofi (autotrofi facoltativi)



Michael F. McGlannan, Florida International University

(a)



Andreas Teske

(b)

Figura 15.29 Habitat tipici dei batteri solfo-ossidanti.

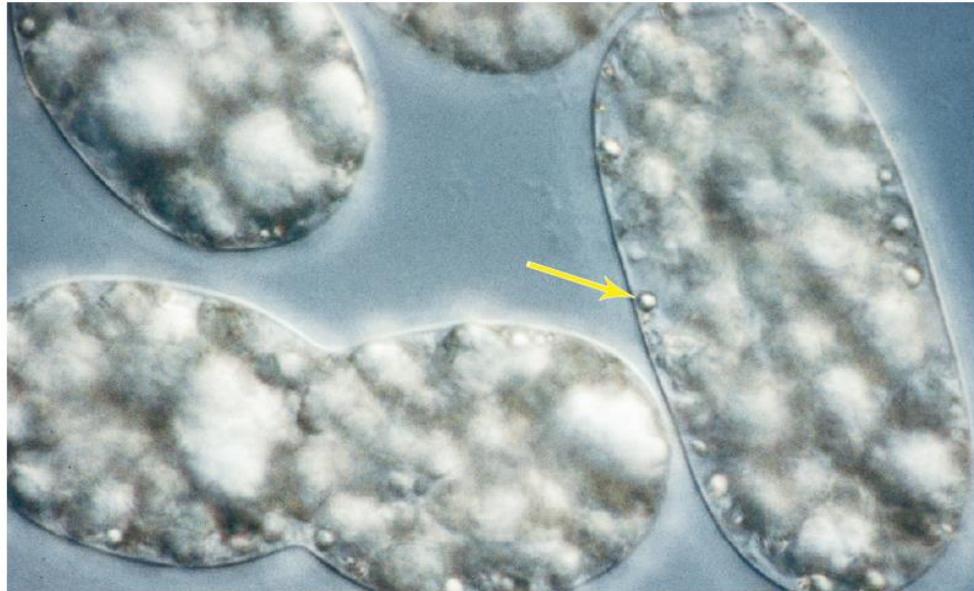
(a) Sorgente solfidrica artesianiana in Florida (USA) contenente solfuri. La rima esterna della sorgiva presenta un denso rivestimento costituito da un tappeto microbico di *Thiothrix* (Figura 15.31 b), che si estende all'intorno per un diametro di circa 1,5 m.

(b) Camini idrotermali a Cathedral Hill, a 2000 m di profondità al fondo del bacino di Guaymas (Messico). Le acque ricche di solfuri fuoriescono dai camini, ricoperti da tappeti microbici di cellule di *Beggiatoa* di colore arancio, bianco e giallo.



Jessup M. Shively

(a)



Hans-Dietrich Babenzien

(b)

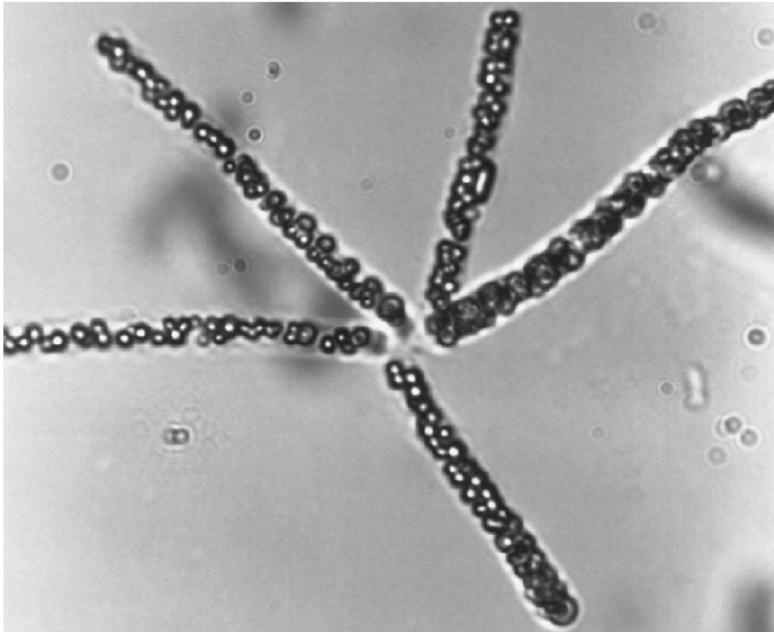
Figura 15.30 Chemiolitotrofi sulfurei non filamentosi.

(a) Micrografia elettronica a trasmissione di cellule dello zolfo-ossidante chemiolitotrofo *Halothiobacillus neapolitanus*. La singola cellula ha un diametro di circa $0,5 \mu\text{m}$. Si notino i corpi poliedrici (carbossisomi) distribuiti all'interno della cellula (indicati dalle frecce) (◀ Figura 14.3). (b) *Achromatium*. Cellule fotografate mediante microscopia a contrasto per interferenza differenziale. Le piccole strutture globulari vicino alla periferia delle cellule (come quella indicata dalla freccia) corrispondono a zolfo elementale, mentre i grossi granuli sono formazioni di carbonato di calcio. Una singola cellula di *Achromatium* ha un diametro di circa $25 \mu\text{m}$.



Verena Salman

(a)



Michael F. McClannan, Florida International University

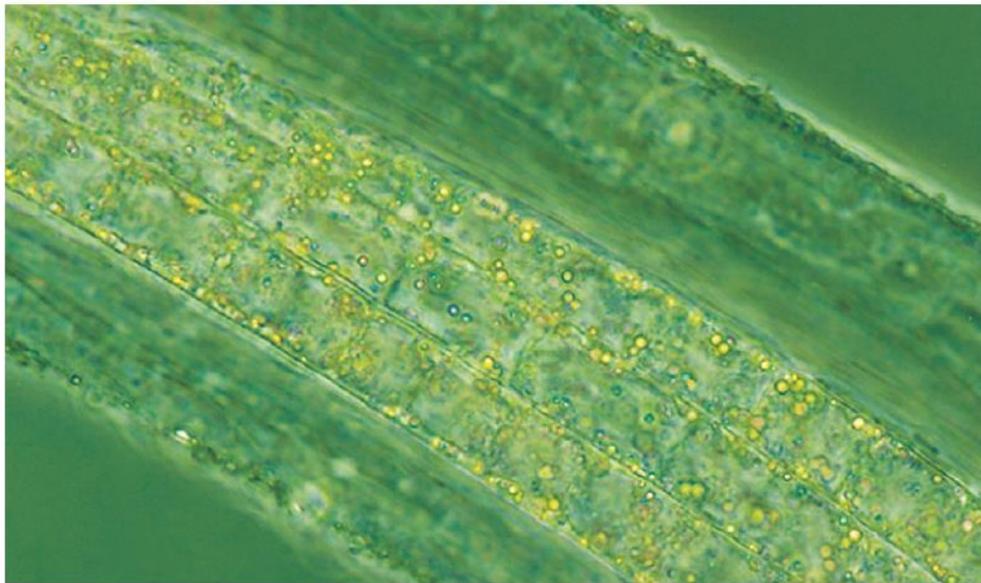
(b)

Figura 15.31 *Thiothrix*. (a) Filamenti di *Thiothrix* adesi a materiale vegetale nelle acque di drenaggio in uscita da una spelonca sulfidrica a Frasassi (Italia). Se misuriamo i filamenti partendo dal punto di inserzione sulla nervatura del detrito vegetale, quello più lungo risulta di circa 4 μm . (b) Microfotografia a contrasto di fase di una rosetta di cellule di *Thiothrix* isolata dalla sorgente artesiana mostrata nella Figura 15.29a. Si notino i globuli di zolfo interni prodotti in seguito all'ossidazione del solfuro. Ogni filamento è lungo circa 4 μm .



Michael Richard

(a)

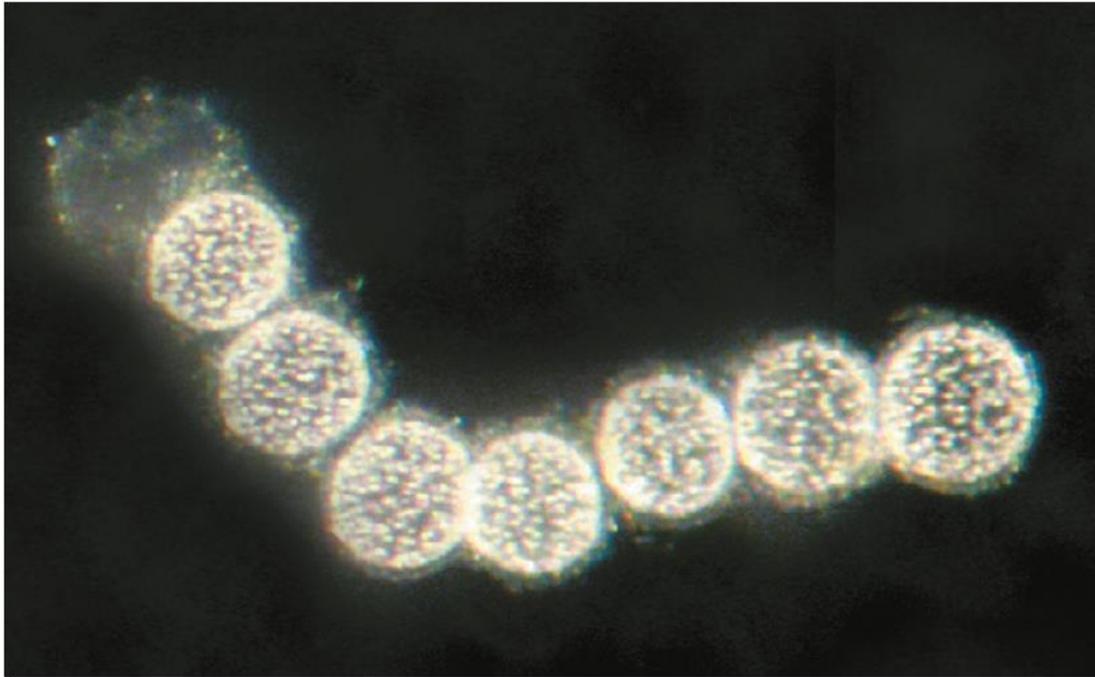


M. Hüttel

(b)

Figura 15.32 Batteri solfo-ossidanti filamentosi.

(a) Microfotografia a contrasto di fase di specie di *Beggiatoa* isolate da un impianto per il trattamento delle acque reflue fognarie. Si noti, in alcune cellule, l'abbondante quantità di granuli di zolfo elementale. (b) Grosse cellule appartenenti a una specie marina di *Thioploca*. Le cellule contengono granuli di zolfo (in giallo) e hanno una larghezza di circa 40-50 μm .

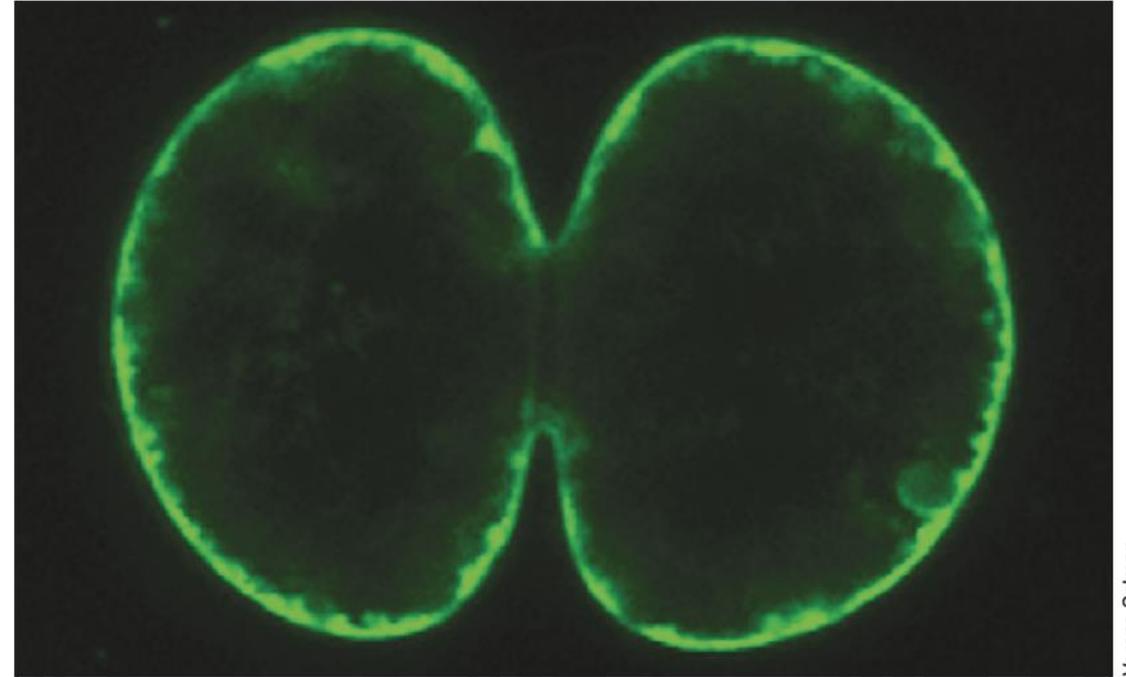


Verena Salzman

(a)

Figura 15.33 Il batterio gigante solfuro-ossidante *Thiomargarita*.

(a) *Thiomargarita namibiensis* isolata da una corrente marina ascendente a largo della costa della Namibia (Africa sud-occidentale). Le cellule qui rappresentate raggiungono un diametro di circa 100 μm . (b) Cellule in divisione del suddetto solfuro-ossidante contenenti vacuoli, prelevate nello stesso sito di campionamento. La fotografia in fluorescenza mostra i ribosomi



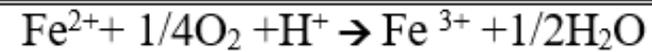
Verena Salzman

(b)

di *Thiomargarita* evidenziati con un colorante fluorescente specifico per gli acidi nucleici. I ribosomi sono presenti nel citoplasma, corrispondente allo strato sottile lungo la rima periferica delle cellule. Il citoplasma si trova schiacciato tra la parete cellulare e il grande vacuolo centrale, caratteristico delle cellule di *Thiomargarita*, vacuolo che nell'immagine appare di colore scuro. Le cellule sono larghe circa 50 μm .

Ossidazioni Fe⁺

Fe²⁺/O₂



Thiobacillus ferrooxidans

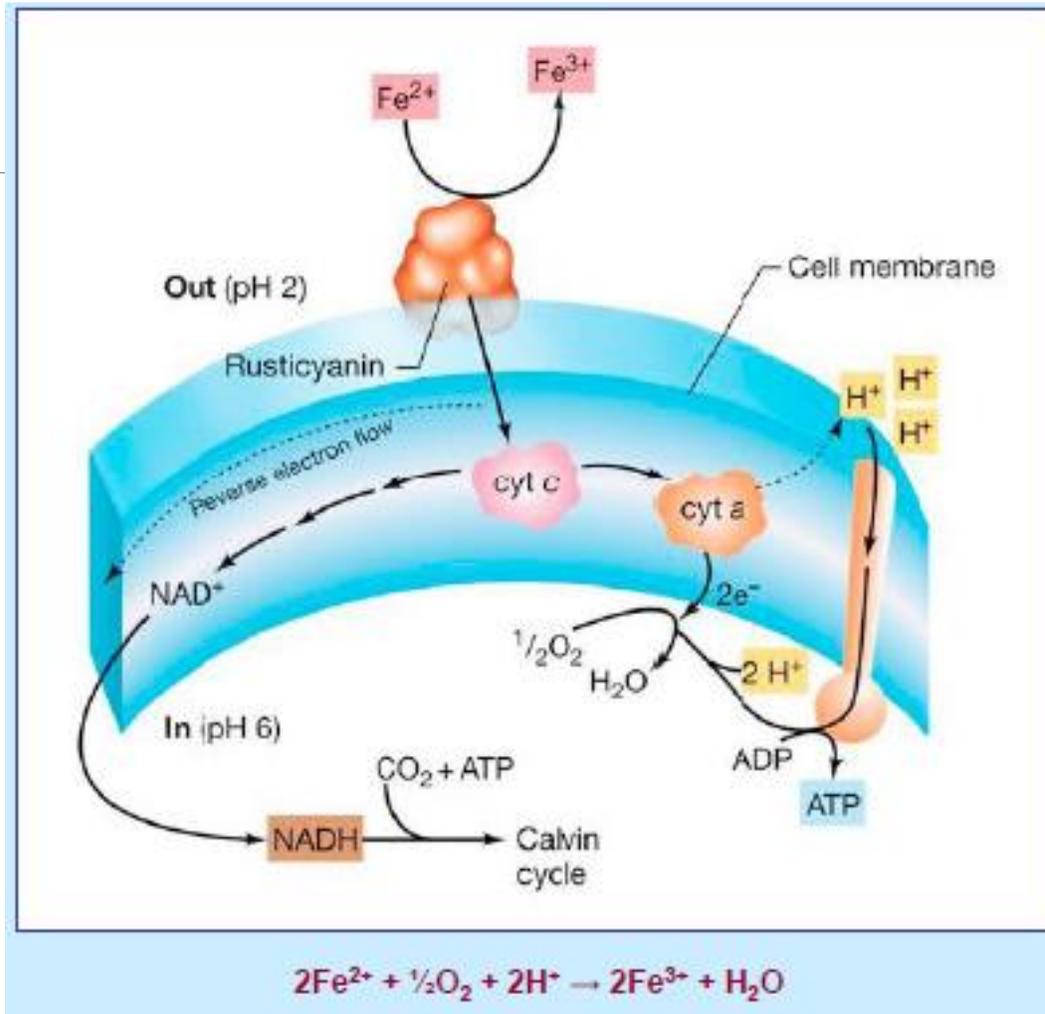
$\Delta G_o' = -10,6$ kcal/mole (a pH 2)

Phylum:

Proteobacteria

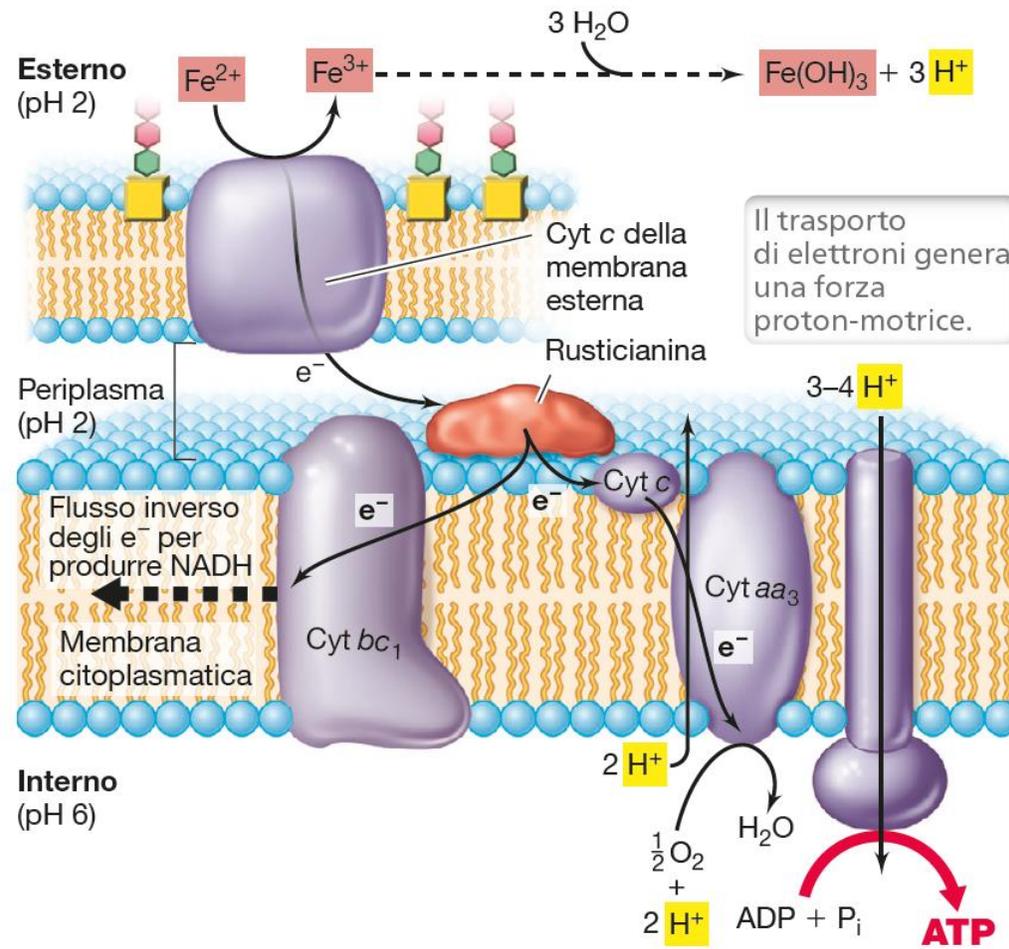
Generi chiave:

Acidithiobacillus e Gallionella



Fe³⁺/Fe²⁺ a pH 2 E°' = +0,77 mV

Fe³⁺ diventa idrato e forma (Fe)OH₃ che precipita

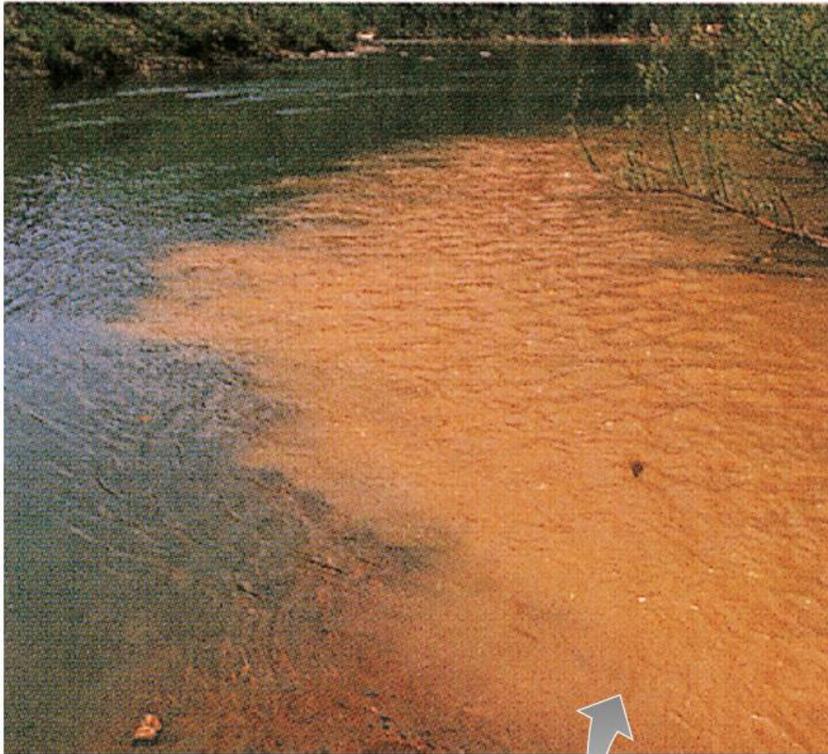


Ferroplasma (Archea) cresce a pH con valori prossimi a 0!

L'ossidazione di Fe²⁺ dona potere riducente per ferrobatteri autotrofi

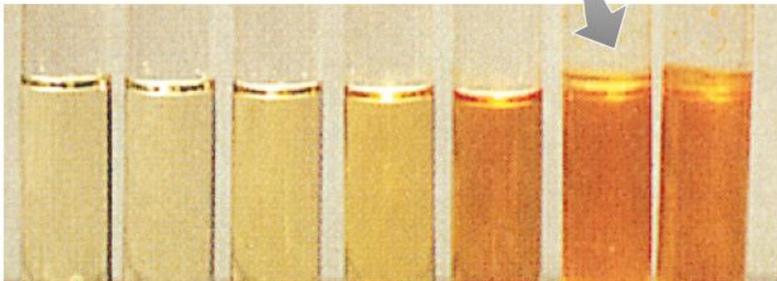
Assimilazione CO₂ attraverso il Ciclo di Calvin

Figura 14.22 Flusso degli elettroni durante l'ossidazione di Fe²⁺ nell'acidifilo *Acidithiobacillus ferrooxidans*. La rusticianina, proteina periplasmatica contenente rame, riceve gli elettroni provenienti da Fe²⁺ ossidato da un citocromo di tipo *c* localizzato nella membrana esterna. Da qui gli elettroni attraversano una breve catena di trasporto degli elettroni fino alla riduzione di O₂ a H₂O. Il potere riducente proviene dal flusso inverso degli elettroni. Si noti il ripido gradiente di pH attraverso la membrana citoplasmatica.



Bill Strode

(a)



T.D. Brock

(b)

Figura 14.21 Batteri ferro-ossidanti. (a) Drenaggi acidi di miniera: è mostrata la confluenza di un fiume e di un torrente proveniente da una miniera di carbone. A bassi valori di pH, Fe^{2+} non si ossida spontaneamente all'aria, ma la sua ossidazione è eseguita da *Acidithiobacillus ferrooxidans*; $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insolubile e sali di complessi ferrici precipitano. (b) Colture di *A. ferrooxidans*. Le provette mostrano diluizioni seriali con crescita assente nella provetta a sinistra e crescita in aumento nelle provette da sinistra verso destra. La crescita è evidenziata dalla produzione di $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

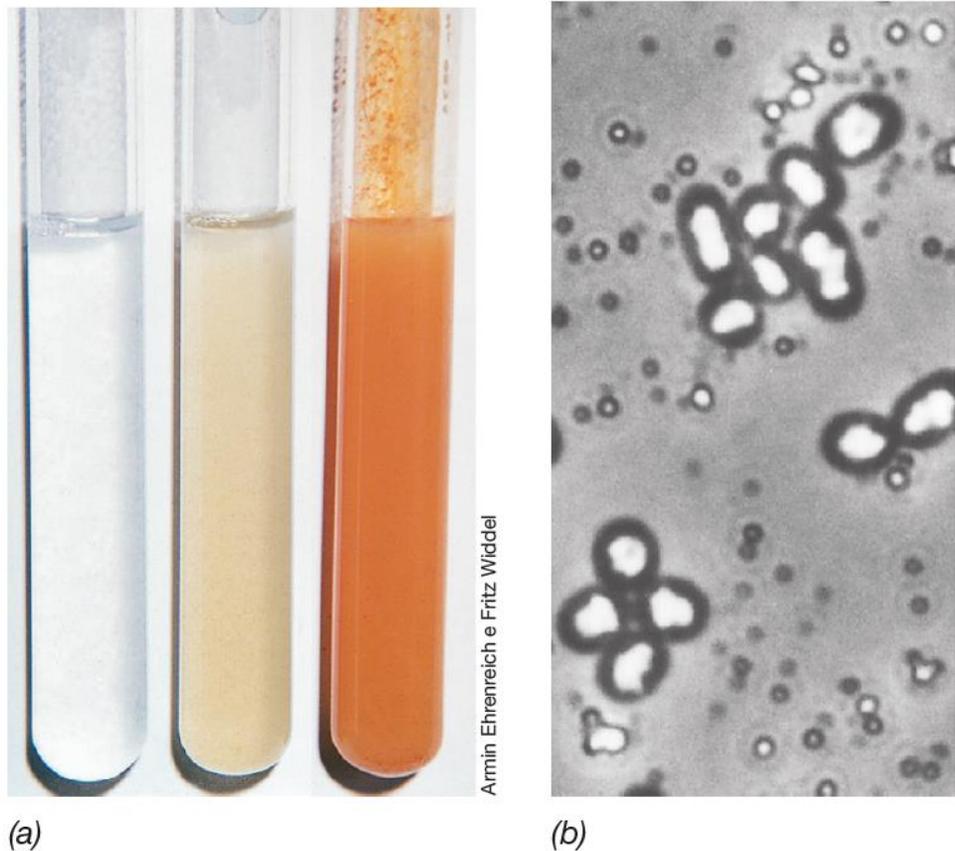


Figura 14.23 Ossidazione di Fe^{2+} nei batteri fototrofi anossigenici. (a) Ossidazione in colture anossiche. Da sinistra a destra: terreno di coltura sterile, terreno inoculato, terreno che mostra crescita data la presenza di $\text{Fe}(\text{OH})_3$. (b) Micrografia a contrasto di fase di un batterio porpora Fe^{2+} -ossidante, ceppo L7. Le zone rifrangenti brillanti all'interno delle cellule sono vescicole gassose (◀ Paragrafo 2.7). I granuli all'esterno delle cellule sono precipitati di ferro. Il ceppo L7 è filogeneticamente correlato al batterio porpora sulfureo *Chromatium*.

A pH neutro il potenziale redox di $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ è pari a +0,2V e può fornire elettroni per la catena di trasporto elettronica fino all'ossigeno

I chemiolitotrofi utilizzano come accettore composti ossidati dell'azoto (NO_3^-) con formazione di NO_2^- ed N_2

Ossidazioni con composti inorganici di N

L'ossigeno è l'unico accettore di elettroni in grado di ossidare i composti ridotti dell'azoto

NH₄⁺/O₂



Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosolobus

$\Delta G_o^\circ = -65.7$ kcal/mole

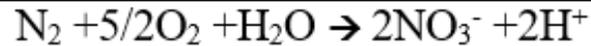
NO₂⁻/O₂



Nitobacter, Nitrococcus, Nitrospina

$\Delta G_o^\circ = -18.1$ kcal/mole

N₂/O₂



$\Delta G_o^\circ = -15,6$ kcal/mole

Benché la reazione sia termodinamicamente favorita nessun batterio è in grado di utilizzare questa fonte di energia vista la stabilità della molecola di N₂.

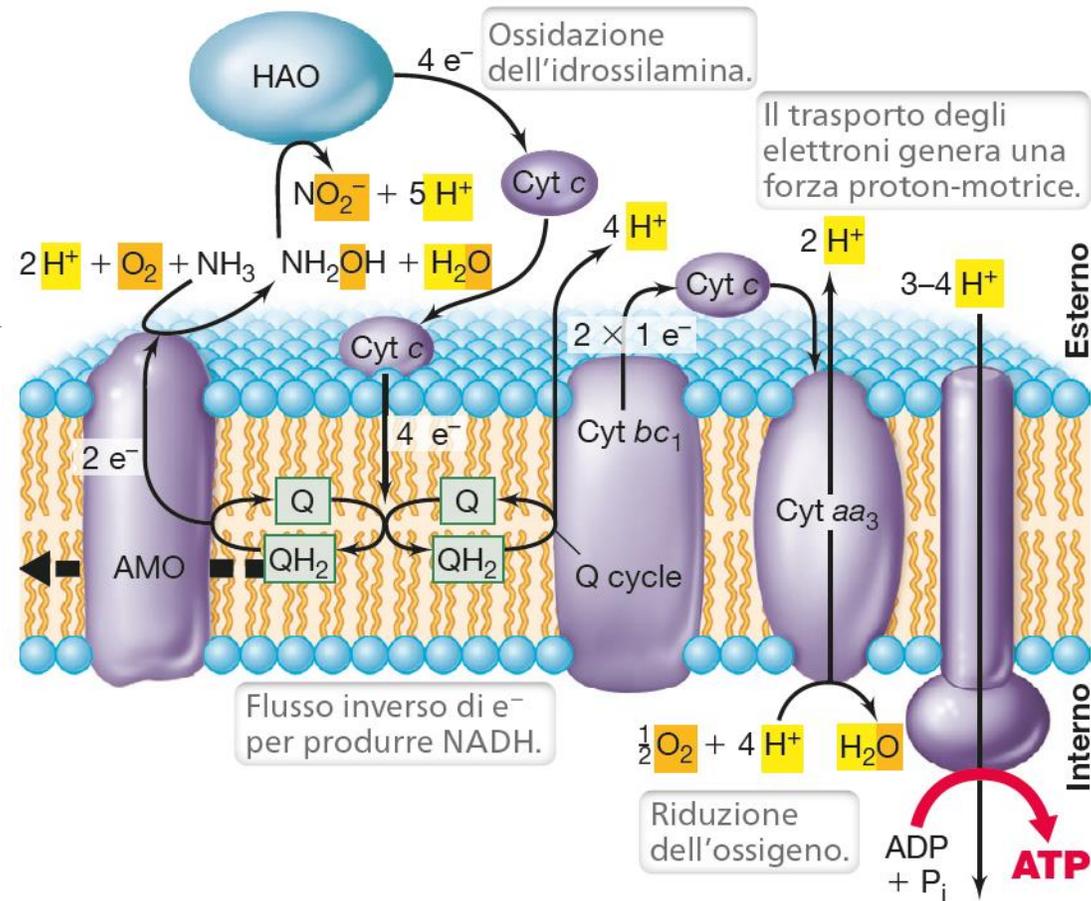


Figura 14.24 Ossidazione di NH_3 e flusso degli elettroni nella membrana citoplasmatica dei batteri ammonio-ossidanti. Sono evidenziati i reagenti e i prodotti di questa serie di reazioni. La superficie superiore della membrana rappresenta l'inizio del periplasma. Il citocromo *c* (Cyt *c*) presente nel periplasma è una forma diversa del Cyt *c* presente nella membrana citoplasmatica. AMO, ammoniaca monossigenasi; HAO, idrossilamina ossidoreduttasi; Q, ubiquinone.

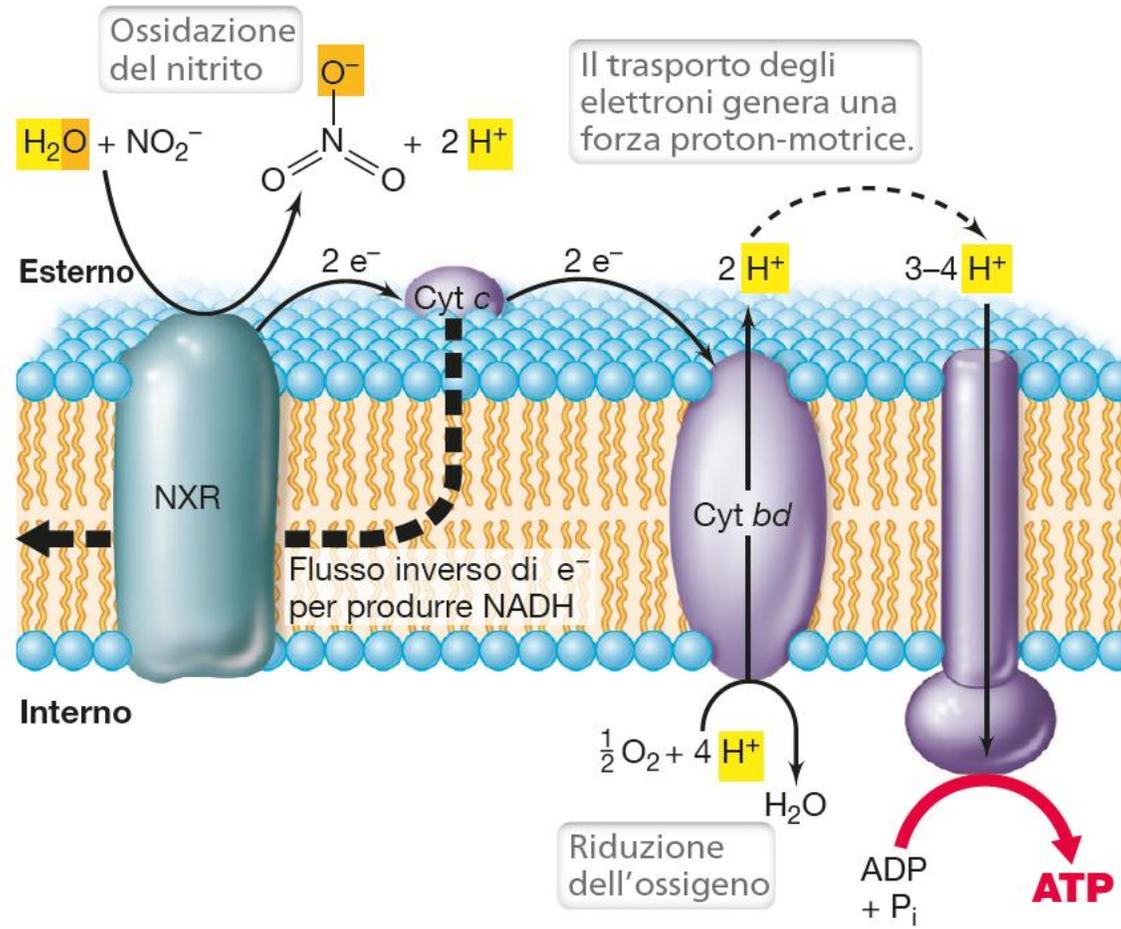
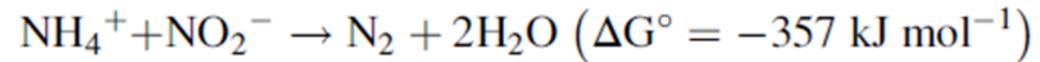


Figura 14.25 Ossidazione di NO_2^- a NO_3^- nei batteri nitrificanti. Per mostrare chiaramente la reazione sono evidenziati i reagenti e i prodotti di questa serie di reazioni. NXR, nitrito-ossidoreduttasi; Cyt, citocromo.

NH₄/NO₂



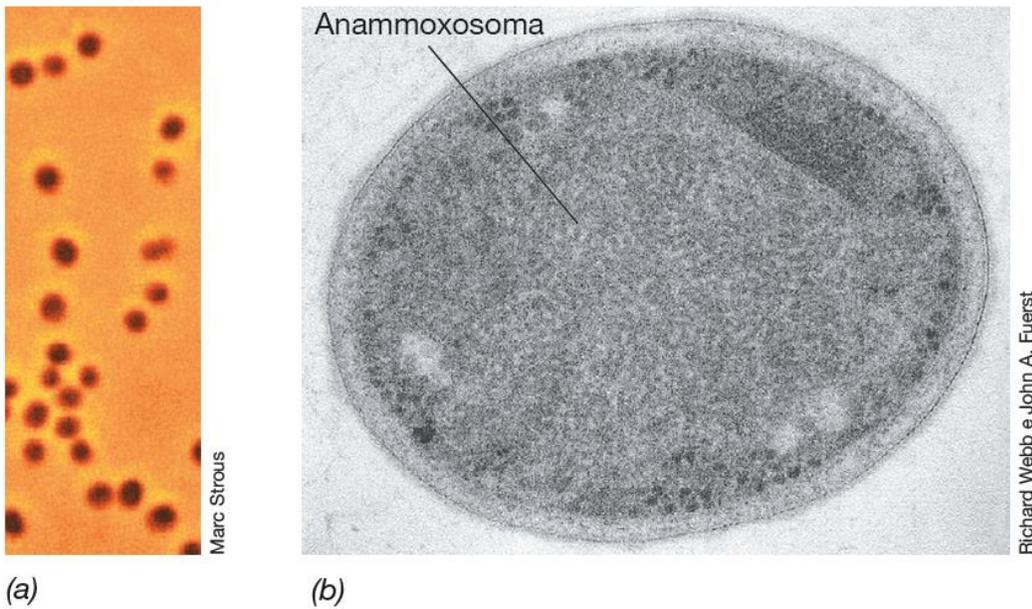
Anammox è un processo biologico in cui viene prodotta energia, in cui il nitrito e l'ammonio vengono convertiti direttamente in azoto molecolare (l'ammonio è il donatore di elettroni e il nitrito l'accettore di elettroni)

Processo metabolico di anaerobi obbligati → *Brocardia anammoxidans* (*Planctomycetes*)

Generi tipo:

- *Brocardia*, *Kuenenia*, *Annamoxoglobus*, *Jettenia*, *Scalindua*

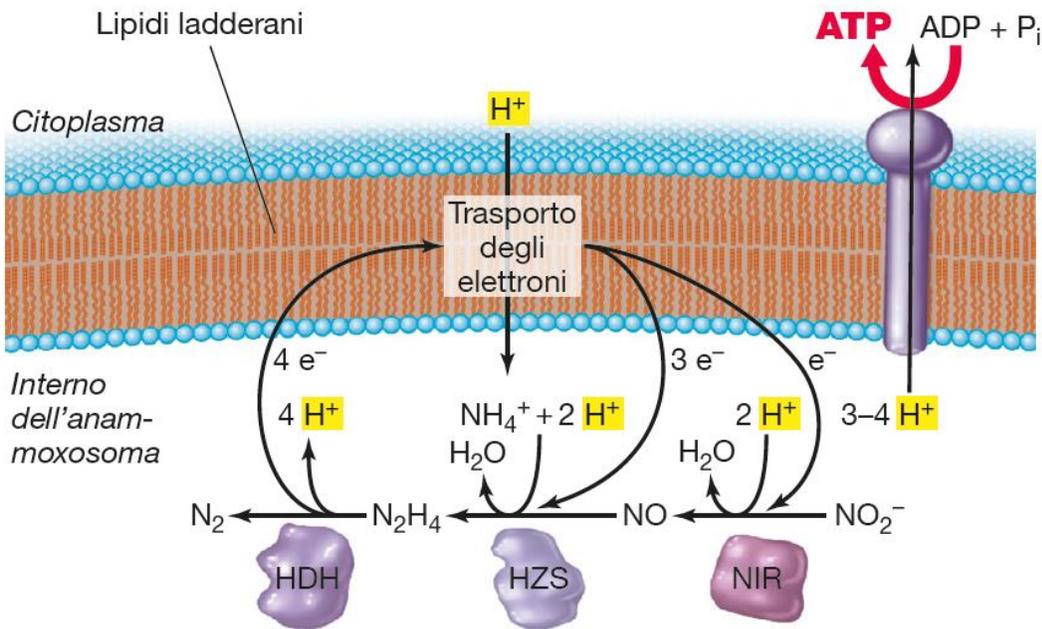
Gli annamoxbacteria possono essere autotrofi ma fissano la CO₂ attraverso la via riduttiva dell'acetil-CoA.



Marc Strous

Richard Webb e John A. Fuerst

(a) (b)



(c)

Figura 14.26 Anammox. (a) Micrografia a contrasto di fase di cellule di *Brocadia anammoxidans*. Una singola cellula ha un diametro di circa $1 \mu\text{m}$. (b) Micrografia elettronica a trasmissione di una cellula di *Brocadia*; si notino i compartimenti membranosi che racchiudono l'anammoxosoma con fibrille di grandi dimensioni. (c) Reazioni che si svolgono nell'anammoxosoma. NIR, nitrito reductasi; HZS, idrazina sintasi; HDH, idrazina deidrogenasi.

Idrazina: N_2H_4

Ruolo ecologico dei batteri annamox

I batteri annamox coesistono con gli aerobi ammonio-ossidanti in acque ricche di ammoniaca come le acque fognarie. I particolati in sospensione in questi ambienti contengono sia zone aerobie che zone anossiche in cui ammonio-ossidanti con metabolismo aerobio ed anaerobico convivono.

Questi organismi sono particolarmente interessanti ai fini del trattamento delle acque reflue in quanto aiuta a diminuire l'immissione di nitrati e nitriti nell'ambiente.

E' probabile che gli annamox marini siano responsabili della rimozione di una frazione significativa di NH_3 che scompare nei sedimenti marini anossici.

Anche i sedimenti lacustri possono sostenere il metabolismo annamox per cui si pensa che in qualsiasi ambiente anossico laddove possano coesistere NH_3 e NO^2 -possa ospitare tale microrganismi

H₂/SO₄²⁻



Desulfovibrio

$$\Delta G_o' = -9.1 \text{ kcal/mole}$$

Questa ossidazione produce maggiore energia di quella con CO₂ e probabilmente avviene preferenzialmente quando ambedue gli ossidanti sono presenti .

H₂/NO₃⁻



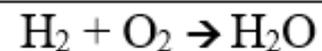
Paracoccus denitrificans

Alcaligenes eutrophus

$$\Delta G_o' = -53,6 \text{ kcal/mole}$$

Questo processo rilascia un considerevole quantitativo di energia. È improbabile che nitrato ed idrogeno raggiungano concentrazioni significative nello stesso ambiente

H₂/O₂



molti batteri chemioautotrofi

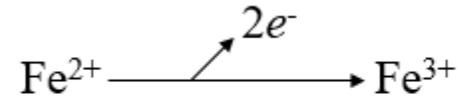
$$\Delta G_o' = -56,7 \text{ kcal/mole}$$

Benché molti chemioautotrofi possano vivere ossidando l'idrogeno con ossigeno è molto improbabile che questi due composti raggiungano concentrazioni significative nello stesso ambiente

Batteri ferro-ossidanti (usano il ciclo di Calvin per organizzare la CO₂)

Galionella (pH neutro)

Thiobacillus ferroxidans (pH 2)

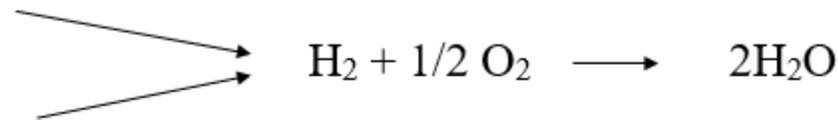


Batteri idrogeno-ossidanti (usano il ciclo di Calvin per organizzare la CO₂, tranne
a) *Hydrogenobacter* che usa il ciclo di Krebs, b) *Methanobacterium* e *Acetobacterium*
che usano l'*Acetyl-CoA pathway*)

(aerobi)

Molti batteri possono vivere

chemioautotroficamente
utilizzando H₂ e O₂



(anaerobi)

Methanobacterium \longrightarrow 4H₂ + CO₂ \longrightarrow CH₄ + 2H₂O (metanobatteri)

Acetobacterium \longrightarrow 4H₂ + CO₂ \longrightarrow CH₃COOH + 2H₂O (acetobatteri)

Hydrogenobacter thermophilus is an extremely [thermophilic](#), straight rod ([bacillus](#)) bacterium.^[2] TK-6 is the [type strain](#) for this species.^[2] It is a [Gram negative](#), non-motile, [obligate chemolithoautotroph](#).^[2] It belongs to one of the earliest branching order of Bacteria.^[3] *H. thermophilus* TK-6 lives in soil that contains hot water.^[2] It was one of the first [hydrogen oxidizing bacteria](#) described leading to the discovery, and subsequent examination of many unique proteins involved in its metabolism.^[2] Its discovery contradicted the idea that no obligate hydrogen oxidizing bacteria existed, leading to a new understanding of this [physiological](#) group.^[2] Additionally, *H. thermophilus* contains a [fatty acid](#) composition that had not been observed before.^[2]

Hydrogenobacter thermophilus is an obligate [chemolithoautotroph](#).^[2] *H. thermophilus* undergoes [aerobic respiration](#) or [anaerobic respiration](#) via [denitrification](#).^[5] The [electron donor](#) is the molecular form of hydrogen, thiosulfate, or elemental sulfur.^[5] Nitrogen sources are [Ammonium](#) and [Nitrate](#) salts.^[2] This bacterium utilizes a special form of the reductive [tricyclic acid cycle](#) ([Reverse Krebs cycle](#)) to fix CO₂.^[5] Various metabolic processes were examined on a 1.5% Bacto-Agar with various organic compounds, [incubated](#) at 50-70 degrees C.^[2]