



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia molecolare Applicata

**Influenza dei metalli sul metabolismo microbico: studio modello
E. coli K-12 DH5ALPHA**

**Influence of metals on microbial metabolism: *E. coli* K-12
DH5ALPHA model study**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Jacopo Brusca

Relatore:

Chiarissima Prof.ssa

Carla Vignaroli

Correlatore:

Chiarissimo Prof.

Donato Giovannelli

Sessione Ordinaria: Luglio

Anno Accademico 2022/2023

1. INTRODUZIONE	2
1.1 - Coevoluzione	5
1.2 - Ruolo dei metalli nel metabolismo	11
1.2.1 - Ferro (Fe)	13
1.2.2 - Rame (Cu)	14
1.2.3 - Molibdeno (Mo) e Tungsteno (W)	15
1.3 - Escherichia coli k12 DH5alpha	16
2 - Fisiologia Batterica e metabolismo microbico	18
2.1 - Fonti di Carbonio	22
3 - Sistemi di respirazione	25
3.1 - Aerobiosi	28
3.1.1 - Citocromo bo3	32
3.1.2 - Citocromo bd-I	33
3.2 - Anaerobiosi	35
3.2.1 Respirazione in anaerobiosi	35
3.2.1.1 - NarGHI	35
3.2.1.2 - NapAB	38
3.2.3 - Fermentazione	40
4. Obiettivi	42
5. Materiali e metodi	44
5.1 - Terreni e Vetreteria	44
5.2 - Glucosio	47
5.3 - Ossigeno e Temperatura	47
5.4 - Nitrato	48
5.5 - Determinazione del pH	49
5.6 Determinazione della crescita	50
5.7 Estrazione delle proteine	50
6. Risultati	53
6.1 - Sistema di crescita aerobico	53
6.1.1 - Valutazione dell'influenza del Ferro nei modelli aerobici	54
6.1.2 - Valutazione del consumo di glucosio nei modelli aerobici	55
6.2 - Sistema di crescita anaerobico	56
6.2.1 Consumo di ossigeno e produzione di acidi organici nei sistemi chiusi	56
7. Discussione	59
8. Conclusioni	63
9. Bibliografia	64

1. INTRODUZIONE

Vita e ambiente sono parte di un binomio che sempre più sta catturando l'attenzione del mondo scientifico e del grande pubblico. “La vita non è un fenomeno accidentale esterno, che ritroviamo sulla superficie della Terra, ma rappresenta quella forza geologica che dà forma alla Terra” (Vernadsky, 1926). Meno di 100 anni fa l'ecologia era simile ad un'idea filosofica più che una scienza. Un mineralogista ucraino nel 1926 concepì una visione “geologica” della vita sulla Terra introducendo un punto di vista sicuramente più moderno e tuttora innovativo fortemente legato ai concetti moderni di ecologia e biogeochimica, pubblicando la sua teoria in un libro chiamato “La Biosfera”, rimasto sconosciuto in occidente per la sua mancata traduzione fino ai primi anni 60.

Secondo Vernadsky, dall'evolversi delle prime forme di vita il sistema geologico e biologico hanno cominciato ad influenzarsi a vicenda sempre di più. Il cambiamento delle condizioni redox della crosta terrestre, ha di fatto stabilito il diffondersi ed il diversificarsi delle tante forme di vita sul pianeta. Una vera e propria coevoluzione, tra la vita e il pianeta, che ha permesso di mantenere le condizioni abitabili per oltre 3.8 miliardi di anni.

Tutte le reazioni chimiche legate o non legate al mondo biologico tendono ad uno stato di equilibrio. Risulta quindi fondamentale studiare gli elementi e le interazioni molecolari che hanno gettato le basi per la genesi morfologica e funzionale di tutte le strutture ed i meccanismi biologici. Va quindi precisato che esiste una gerarchia di importanza sul piano biologico tra gli elementi naturali pur sapendo che quasi tutti gli elementi conosciuti influenzano o costituiscono la materia su cui si forma e si evolve la vita. Ciascun elemento chimico possiede la capacità di formare legami più o meno forti con gli atomi e le molecole vicine. Questo principio fa sì che per la loro massa atomica e per la loro configurazione elettronica ci siano elementi che si prestano meglio a ruoli strutturali ed altri a ruoli più

funzionali. Elementi fondanti come il carbonio, dove tutte le reazioni organiche nelle quali è coinvolto sono caratterizzate da interazioni molto stabili. Risulta quindi facile capire perché sia più abbondante nei composti organici e nella biomassa. Altri elementi hanno un ruolo non prettamente strutturale ma legato più alla funzione biologica e per questo meno abbondanti (ma non meno importanti), come ad esempio gli elementi legati a molecole enzimatiche o a molecole con strutture transitorie, caratterizzate dalla continua formazione e rottura di legami deboli.

Il trasferimento di elettroni e la formazione o la rottura di legami causano alterazioni nella quantità di energia libera del sistema e questo di conseguenza favorisce o inibisce la formazione di altri legami rendendo l'ambiente circostante più o meno riducente. In base a questo, ciascun elemento possiede la potenzialità di formare legami sulla base dei propri elettroni di valenza. Le leggi della termodinamica ci aiutano a capire questi processi. Tra tutte le reazioni chimiche esistenti esiste una gamma di processi di ossido-riduzione che le forme di vita hanno cominciato a usare, e sfruttando questo tipo di interazioni molecolari orchestrano la formazione e la rottura di specifici legami per determinare la sintesi, la morfologia e la funzione di tutte le strutture dei meccanismi biologici.

La classificazione chimica degli elementi ci dice anche che alcuni hanno tra loro delle somiglianze e su alcuni parametri possono essere considerati equivalenti. Possiamo affermare che la vita si basa sull'energia acquisita o ceduta dai processi di trasferimento degli elettroni e in questi processi svolgono un ruolo centrale una classe specifica di enzimi che sono le ossidoreduttasi (Enzyme Classification EC 1). Queste spesso contengono metalli di transizione nelle loro strutture e di fatto, usano la loro regione catalitica per fornire o acquisire elettroni. Per farlo usano elementi con una configurazione elettronica in grado di

poter cedere o acquisire elettroni di legame, rendendo i metalli di transizione particolarmente adatti a questo ruolo.

Il modello di cui si parla (soprattutto per le ossidoreduttasi terminali delle catene respiratorie) è un modello di tipo Donatore-Acettore, dove l'enzima usa i vari domini per facilitare il transfert elettronico dall'uno all'altro o viceversa. A conferma che per la formazione di nuove molecole, esiste una gerarchia degli elementi che gli organismi scelgono, sappiamo che alcuni elementi proprio per le loro caratteristiche simili possono sostituirsi vicendevolmente nello svolgere una specifica funzione biologica. Per esempio esistono enzimi che hanno la possibilità tramite piccolissimi adattamenti conformazionali, di usare nei loro siti catalitici un elemento piuttosto che un altro. Datando questi organismi e valutando la gamma di elementi che li compongono, è possibile creare una mappa temporale relativa all'avvento dei vari tipi di metabolismi e alle strategie molecolari che si sono diversificate in relazione alle ere geologiche. Incrociando queste mappe con ciò che sappiamo sull'evoluzione geologica della crosta terrestre, otteniamo un quadro che supporta l'ipotesi abbastanza recente, che le strutture e i meccanismi molecolari più diffusi oggi a livello biologico, derivano da step evolutivi dovuti ad una coevoluzione fra ambiente e forme di vita, dove al variare della composizione chimica dell'ambiente, si sono evolute strutture che usavano elementi del nuovo habitat.

1.1 - Coevoluzione

La storia evolutiva delle specie viventi sulla Terra fornisce molti esempi di come le componenti fisico-chimiche ambientali abbiano determinato la genesi strutturale e funzionale degli organismi e per tutto il tempo nel quale la vita si è evoluta è sempre esistito un forte feedback tra la geosfera e la biosfera; quindi l'evoluzione e l'innovazione biologica possono essere collegate all'evoluzione degli ambienti antichi sulla Terra (Zerkle et al., 2005). Basti pensare alla distribuzione delle nicchie ecologiche in relazione ai cicli biogeochimici, o agli adattamenti degli organismi agli ambienti più estremi.

In generale tutti i trasferimenti di elettroni non in equilibrio sulla Terra sono guidati da un insieme di “nanomacchine” biologiche composte in gran parte da complessi proteici multimerici associati a un piccolo numero di gruppi protesici (*sensu* Falkowski et al., 2008). Queste macchine si sono evolute esclusivamente nei microrganismi all'inizio della storia del nostro pianeta eppure, nonostante la loro antichità, sono altamente conservate. Quindi, sebbene esista un'enorme diversità genetica in natura, rimane un insieme relativamente stabile di geni fondamentali che codificano per le principali reazioni redox essenziali per la vita e i cicli biogeochimici. Questi geni hanno avuto origine e si sono coevoluti con cicli biogeochimici e sono stati trasmessi da microrganismo a microrganismo principalmente mediante trasferimento genico orizzontale (Falkowski et al., 2008).

L'evoluzione e l'adattamento in questo caso possono essere espressi come piccoli step nei quali le forme di vita si trovano davanti alla necessità di dover adattare o modificare dei meccanismi biologici al fine di sopravvivere o di ottenere condizioni di crescita migliori. Questa relazione tra ambiente e forme di vita ha, per esempio, permesso di creare dei modelli nei quali, usando i genomi completi di determinati organismi, si è in grado di mappare la distribuzione e la composizione chimica degli ambienti nelle ere geologiche. Valutando

quelle che sono le firme geochimiche di ciascun elemento è stato determinato il frazionamento isotopico, così da quantificare la rapidità con cui si è affermato l'uso di quell'elemento nei composti organici (Dupont et al., 2010). Da queste premesse, tramite la genomica comparativa e studi sulla struttura delle proteine, oltre che riuscire a sapere quali elementi fossero più abbondanti nelle ere geologiche nelle quali la vita ha cominciato a diffondersi e diversificarsi, è stato possibile capire quando si sono affermate determinate strutture biologiche e determinati meccanismi molecolari.

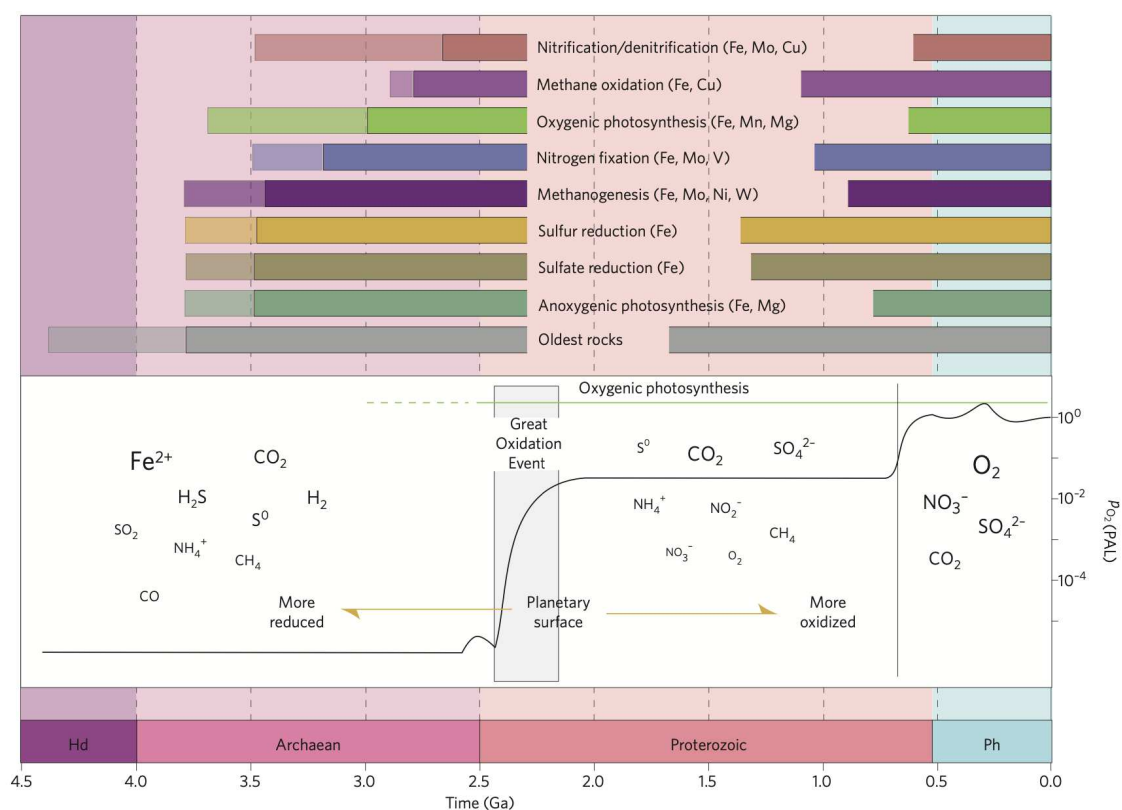


Figura 1. Rappresentazione per età delle prove geochimiche conservate dei metabolismi arcaici di miliardi di anni fa (Ga) e dell'ossigenazione globale. Le barre di età scure rappresentano le età con una stima più accurata, mentre quelle più chiare rappresentano le età meno sicure. I metalli elencati tra parentesi sono utilizzati nelle proteine ossidoreduttasi (EC1) associate a ciascun metabolismo. Rappresentazione schematica dell'aumento dell'ossigeno nel corso della storia della Terra. I due principali eventi di ossigenazione sono presentati insieme alla disponibilità di donatori e accettori di elettroni rilevanti (dimensioni proporzionali alla disponibilità dedotta). Hd, Hadean; Ph, Fanerozoico (Moore et al., 2017).

Riguardo al ruolo dei metalli, questa costante evolutiva fondamentale lascia intuire che la selezione di un elemento avviene con l'esclusione di un altro (Dupont et al., 2010). C'è stato un periodo durante i primi anni di esistenza della vita su questo pianeta, nel quale mancavano sia delle strutture necessarie per controllare le concentrazioni intracellulari di metalli sia delle proteine leganti i metalli che catalizzano il trasporto degli elettroni e le trasformazioni redox.

La disponibilità di diversi metalli e substrati è cambiata nel corso della storia della Terra a seguito di cambiamenti secolari nelle condizioni redox, in particolare l'ossigenazione globale. Lo sviluppo di strutture proteiche che lavoravano prima con il Fe e poi con Zn e Ca e quelle per l'omeostasi di questi metalli, ha coinciso con l'emergere e il diffondersi di strutture specifiche per i metalli, che legavano prevalentemente quelli più abbondanti nell'oceano archeano (Moore et al., 2017). Le nuove vie metaboliche che utilizzano diversi metalli di transizione si sono coevolute insieme alle mutevoli condizioni redox. La riduzione dello zolfo, la riduzione del solfato, la metanogenesi e la fotosintesi anossigenica sono apparse all'incirca da 3,8 a 3,4 miliardi di anni fa (Blankenship, 1992). Le ossidoreduttasi responsabili di questi metabolismi incorporavano metalli che erano prontamente disponibili, che erano principalmente Fe e complessi ferro-zolfo.

La fotosintesi ossigenica è apparsa tra 3,2 e 2,5 miliardi di anni fa, così come l'ossidazione del metano, fissazione dell'azoto, nitrificazione e denitrificazione (Jelen et al., 2016). Questi metabolismi si basano su una gamma ampliata di metalli di transizione presumibilmente resi disponibili dall'accumulo di ossigeno molecolare nelle croste del suolo e nei tappeti microbici marini (Smrzka et al., 2019). L'utilizzo del rame negli enzimi prima del grande evento di ossidazione è particolarmente importante, poiché il rame è fondamentale per il ciclo dell'azoto e del metano e infatti è stato trasmesso a numerosi metabolismi aerobici successivamente. Potenzialmente, ciò ha promosso la diversificazione delle linee emergenti

di Archaea e Batteri attraverso l'istituzione di cicli biogeochimici. Al contrario, le strutture leganti Cu e Zn si sono evolute molto più tardi, fornendo un'ulteriore prova di come la disponibilità ambientale abbia influenzato la selezione degli elementi. Le proteine leganti Zn in tarda evoluzione risultarono fondamentali per lo sviluppo degli eucarioti e anzi è probabile che la biodisponibilità di Zn possa essere stato uno dei fattori che ne ha limitato inizialmente l'evoluzione.

La diversità dei metalli utilizzati nelle ossidoreduttasi è aumentata nel tempo, suggerendo che il potenziale redox superficiale e l'incorporazione di metalli hanno influenzato l'evoluzione del metabolismo, il trasferimento biologico di elettroni e l'ecologia microbica. Oltre che al singolo dato di abbondanza e disponibilità del metallo, per capire le dinamiche di crescita di organismi in una specifica nicchia ecologica è utile incrociare questi dati con i metabolismi presenti e le funzioni biologiche che svolgono per essi. A tal proposito sono già stati effettuati esperimenti che attribuiscono alla concentrazione dei metalli la causa della diversa distribuzione nella nicchia ecologica di organismi con metabolismi simili ma che adoperano enzimi con metalli differenti (Shafiee et al., 2021).

Per quanto il quadro generale degli eventi supporti questo modello sappiamo anche che determinati cofattori metallici si sono affermati in ere nelle quali tali metalli non erano tra gli elementi più abbondanti. Questo apparente paradosso si basa su un presupposto, non verificato, che solo i metalli solubili siano biodisponibili. Un esempio sono gli enzimi per l'azoto fissazione di *Azotobacter vinelandii*, in questo caso infatti la maggior parte delle nitrogenasi usa Mo come cofattore; tuttavia, sono possibili anche le forme che usano V e Fe. In passato si credeva che la fissazione dell'azoto si fosse evoluta durante i tempi dell'Archeano-Proterozoico utilizzando il Fe come cofattore. Tuttavia, i valori $\delta^{15}\text{N}$ dei sedimenti paleo-oceanici suggeriscono l'utilizzo di Mo e V come cofattori nonostante le loro

basse concentrazioni nei paleo-oceani, andando a costituire così un paradosso. Tramite studi sui chelanti di *Azotobacter* è stato visto che i metalli in traccia associati ai minerali sono biodisponibili come cofattori delle nitrogenasi e possono supportare la fissazione di N_2 in quegli ambienti dove mancano i metalli traccia solubili, andando così a fornire una risposta parziale al paradosso (Srivastava et al., 2023).

Se pur sembri evidente il nesso tra le concentrazioni dei metalli e l'espressione delle ossidoreduttasi, le informazioni in nostro possesso circa il ruolo della disponibilità ambientale dei metalli nel controllare le funzioni microbiche sono limitate, e rimane cruciale capire quali siano i fattori che intervengono negli organismi quando in un ambiente uno o più elementi in tracce limitano la crescita.

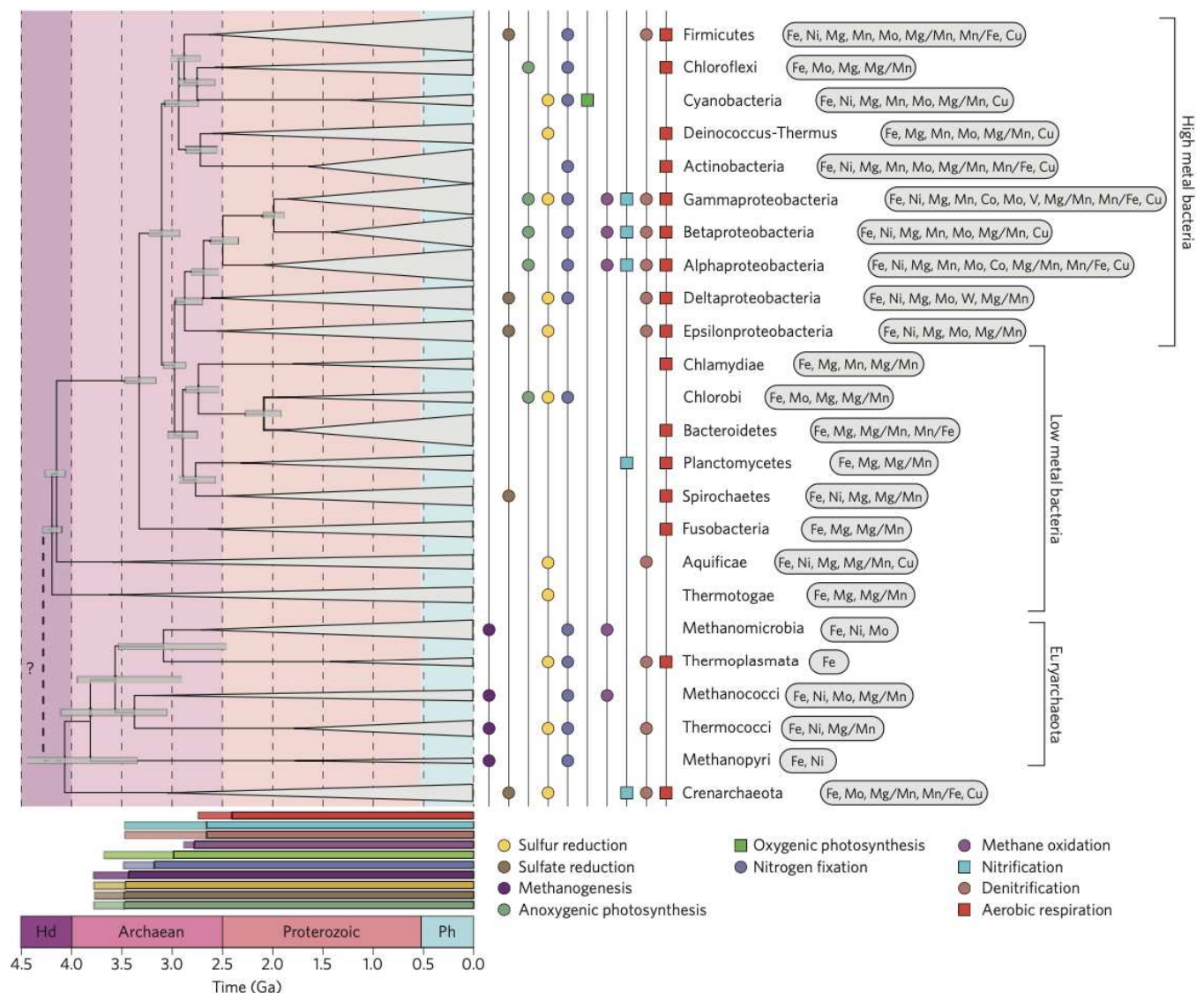


Figura 2. Albero filogenetico rappresentante i principali gruppi di Batteri e Archaea e dei loro tempi di divergenza presunti. Gli intervalli di confidenza della divergenza sono disegnati come barre di scala attorno ai rispettivi nodi (rappresentati da rettangoli grigio chiaro). L'ultimo antenato comune è stato arbitrariamente collocato a 4,25 Ga nell'albero come descritto precedentemente da Batistuzzi et al.93. I tempi di divergenza stimati sono stati ricavati per gli Archaea e per i Bacteria. La posizione del primo vertice di ciascun poligono rappresenta la distanza filogenetica della prima divisione interna al taxa. L'area del poligono è proporzionale al numero di sequenze presenti nel database SILVA rRNA SSU dei ceppi tipo. Le età del metabolismo sono riportate nella Fig. 1. Scala temporale: Hd, Hadeano; Ph, Fanerozoico (Moore et al., 2017).

1.2 - Ruolo dei metalli nel metabolismo

I metalli in traccia possono agire come induttori dei metalloregolatori, cofattori di enzimi biosintetici di prodotti naturali e anche formare complessi funzionali con metaboliti secondari. La chimica fondamentale degli oligoelementi determina la speciazione molecolare e la reattività sia all'interno delle cellule che nell'ambiente in generale. Nonostante i principali sei elementi costitutivi di tutte le macromolecole biologiche siano H, C, N, O, S e P, va sottolineata l'importanza dei metalli nel funzionamento del metabolismo cellulare.

La metallomica, ossia l'analisi completa dell'insieme delle specie metalliche e metalloidi all'interno di una cellula, o di un tipo di tessuto, che variano in base a metabolismo, tolleranza all'ossigeno, temperatura di crescita ottimale e alla filogenesi, è una branca emergente delle tecniche di omica che si affianca ai tradizionali studi di genomica, trascrittomica e proteomica. Molte vie biologiche contengono almeno un metalloenzima e di conseguenza richiedono Mg, K, Ca, Fe, Mn e Zn per sostenere la vita. Altri elementi, come Cu, Mo, Ni, Se e Co, sono comunque richiesti da molti organismi ma l'utilizzo degli oligoelementi varia notevolmente tra le specie.

L'ipotesi è che l'uso dei metalli nei procarioti come gruppo generalmente segua la gerarchia: $\text{Fe} \gg \text{Zn} > \text{Mn} \gg \text{Mo}, \text{Co}, \text{Cu} \gg \text{Ni} > \text{W}, \text{V}$. Potenzialmente, è stata questa gerarchia che ha promosso la diversificazione delle linee genetiche emergenti di Archaea e Batteri attraverso la formazione dei cicli biogeochimici (Dupont et al., 2010). All'interno della cellula i metalli competono per i siti di legame delle proteine; quindi, sono necessarie estese reti proteiche che coinvolgono trasportatori e proteine regolatrici sensibili al metallo per mantenere le concentrazioni subcellulari appropriate di ciascun elemento e, in alcuni casi, trasportano direttamente ciascun metallo alla sua metalloproteina richiesta nel compartimento cellulare appropriato.

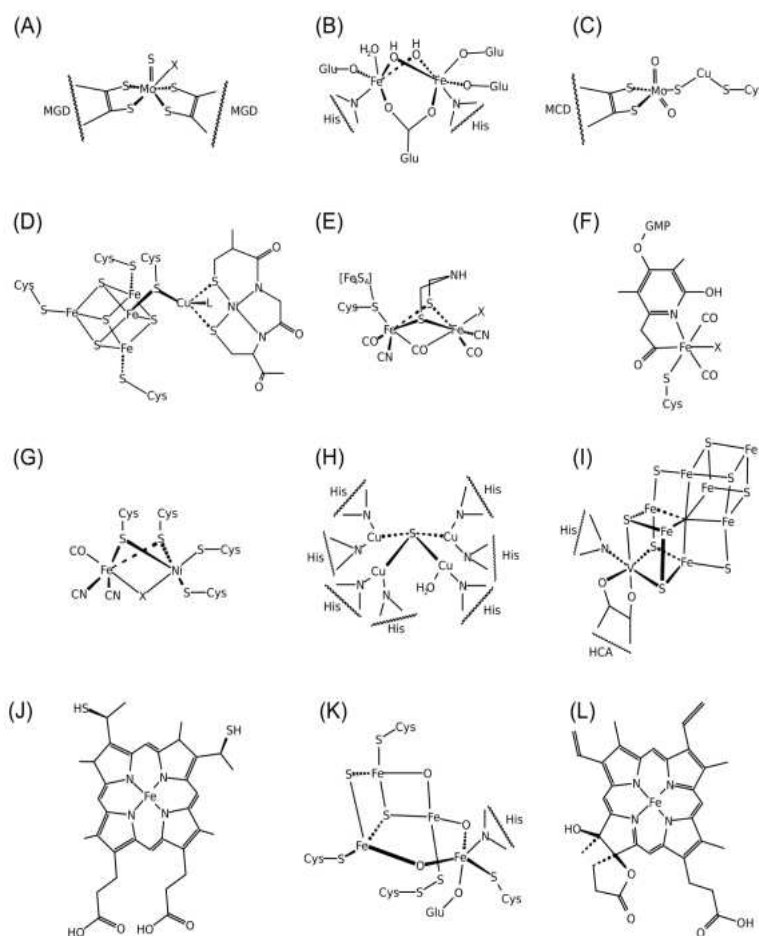


Figura 3. Strutture chimiche di cofattori contenenti metalli rilevanti dal punto di vista biogeochimico da ossidoreduttasi procariotiche: (A) il sito catalitico contenente Mo di Formiato deidrogenasi (fdhF, 1FDO); (B) il cluster FeO del solubile metano monoossigenasi idrossilasi (mmoX, 1MHY); (C) il Mo-Cu-contenente cluster nel sito attivo della CO deidrogenasi (coxL, 1ZXI); (D) il centro Ni-Fe-Cu della anaerobica monossido di carbonio deidrogenasi (codh, 1MJG); (E) i centri catalitici della [FeFe]-idrogenasi (hydA, 6N59), [Fe]-idrogenasi (F) (hmd, 6HAV) e [NiFe]-idrogenasi (G) (hydB, 5XLF); (H) il cluster [Cu₄S] del protossido di azoto reductasi (nosZ, 1FWX); (I) il Cofattore FeVco della nitrogenasi contenente V (vnfD, 5N6Y); (J) l'eme C contenuto in diverse ossidoriduttasi (hzsA, hdh, nrfA, nirS, hao, tsdA [5C2V, 6HIF, 2J7A, 6TSI, 1FGJ, 4V2K]); (K) il cluster ibrido dall'ibrido Cluster Protein da *Desulfovibrio vulgaris* (hcp, 1E1D); (L) il Cis-heme idrossiclorina gamma-spirolattone (cydA e appC, 6RKO e 7OY2)(Hay Mele et al., 2023).

1.2.1 - Ferro (Fe)

Il Ferro (Fe) è un metallo di transizione di prima fila. In condizioni fisiologiche, esiste principalmente in uno dei due stati redox facilmente interconvertibili: la forma ferrosa Fe^{2+} ridotta e la forma ferrica Fe^{3+} ossidata. Può anche adottare diversi stati di spin (alto o basso) sia nella forma ferrica che in quella ferrosa, a seconda del suo ambiente ligando. Queste proprietà rendono il Fe un componente protesico estremamente versatile per l'incorporazione nelle proteine come biocatalizzatore o vettore di elettroni. Il Fe è anche un metallo abbondante, essendo il quarto elemento più abbondante nella crosta terrestre. Per questi motivi, si ritiene che il Fe sia stato la scelta ideale per l'incorporazione nelle proteine durante l'evoluzione agli albori della vita ed è stato probabilmente il costituente chiave nelle prime frazioni protesiche (Andrews et al., 2003).

In diversi batteri, l'assimilazione del Fe avviene attraverso molecole chelanti il Fe chiamate siderofori, in grado di legare il Fe dalla maggior parte dei complessi inorganici e organici semplicemente per spostamento all'equilibrio (Locatelli et al., 2016). Tuttavia, questo elemento non è facilmente disponibile per i microrganismi in ambienti aerobici non acidi. Da un lato, Fe^{3+} è insolubile e dall'altro, Fe^{2+} è altamente tossico per le cellule batteriche. Di conseguenza, l'assorbimento del Fe è attentamente regolato principalmente dalla regolazione trascrizionale Fe-dipendente. I batteri possono colmare il "gap di concentrazione" tra la solubilità del Ferro ferrico e il fabbisogno di ferro solubilizzando gli ossidi ferrici. Ciò può essere ottenuto in tre modi: (i) abbassando il pH esterno per rendere il ferro ferrico più solubile; (ii) ridurre il ferro ferrico alla forma ferrosa relativamente solubile; o (iii) impiegare chelanti di ioni ferrici come agenti solubilizzanti (Abdul-Tehrani et al., 1999). La famiglia dei siderofori comprende una varietà di strutture chimiche di almeno 500 gruppi diversi.

1.2.2 - Rame (Cu)

Il rame (Cu) è uno ione metallico attivo redox e, sebbene potenzialmente pericoloso per una cellula, è anche un importante cofattore in vari enzimi e proteine di trasporto degli elettroni, enzimi che catalizzano reazioni fondamentali per la vita dei microrganismi quali la nitrificazione, la denitrificazione, l'ossidazione aerobica dell'ammoniaca, l'ossidazione aerobica del metano e la respirazione aerobica (Moore et al., 2017).

I sistemi biologici non utilizzavano il rame (Cu) prima dell'avvento dell'ossigeno atmosferico. Nelle condizioni riducenti che prevalevano prima di questo evento, il rame si trovava allo stato di Cu(I) insolubile in acqua e non era disponibile per i processi biologici. La comparsa di ossigeno in atmosfera, di cui i cianobatteri risultano essere i responsabili, ha cambiato in modo irreversibile la vita sulla Terra generando la necessità di un metallo redox-attivo con un potenziale compreso tra 0 e 0,8 V; il rame (Cu), associato ad enzimi che lavorano tra 0,2 e 0,75 V, è stato, quindi, perfetto per questo ruolo. Le proteine del rame (Cu) sono ampiamente distribuite negli organismi aerobi e svolgono principalmente due funzioni: il trasferimento e il trasporto di elettroni e la riduzione dell'ossigeno (Rensing and Grass, 2003).

1.2.3 - Molibdeno (Mo) e Tungsteno (W)

Il molibdeno (Mo) e il tungsteno (W) sono rispettivamente elementi di transizione di seconda e terza fila, che si trovano in forma mononucleare nel sito attivo di un gruppo eterogeneo di enzimi che generalmente catalizzano reazioni di trasferimento di atomi di ossigeno. Nonostante l'elevata somiglianza tra le proprietà chimiche di Mo e W, gli enzimi contenenti W rappresentano solo una piccola percentuale rispetto agli enzimi contenenti Mo. Il

tungsteno (W, numero atomico 74) e il molibdeno (Mo, 42) sono elementi chimicamente analoghi, ed entrambi sono relativamente scarsi negli ambienti naturali.

La classificazione effettuata per i molibdo-enzimi si basa sull'omologia strutturale dei loro siti attivi; risultano così tre famiglie: (1) idrossilasi a molibdeno con un centro mono-osso-molibdeno appartengono alla famiglia delle xantine ossidasi, (2) le osso-transferasi con un centro di di-osso-molibdeno appartengono alla famiglia delle solfito ossidasi, e (3) le osso-transferasi batteriche appartengono alla famiglia delle DMSO reductasi, in cui due molecole di pterina coordinano un centro di molibdeno (Mendel, 2005). L'idea che uno dei due possa avere un ruolo biologico significativo è forse sorprendente se si considera che, con l'eccezione dello iodio, le forme di vita su questo pianeta tipicamente prosperano utilizzando elementi con numero atomico inferiore a 35 (Johnson, 1996). Il Molibdeno gioca un ruolo fondamentale come cofattore all'interno di numerosi enzimi coinvolti sia nel ciclo dell'azoto che nel ciclo dello zolfo.

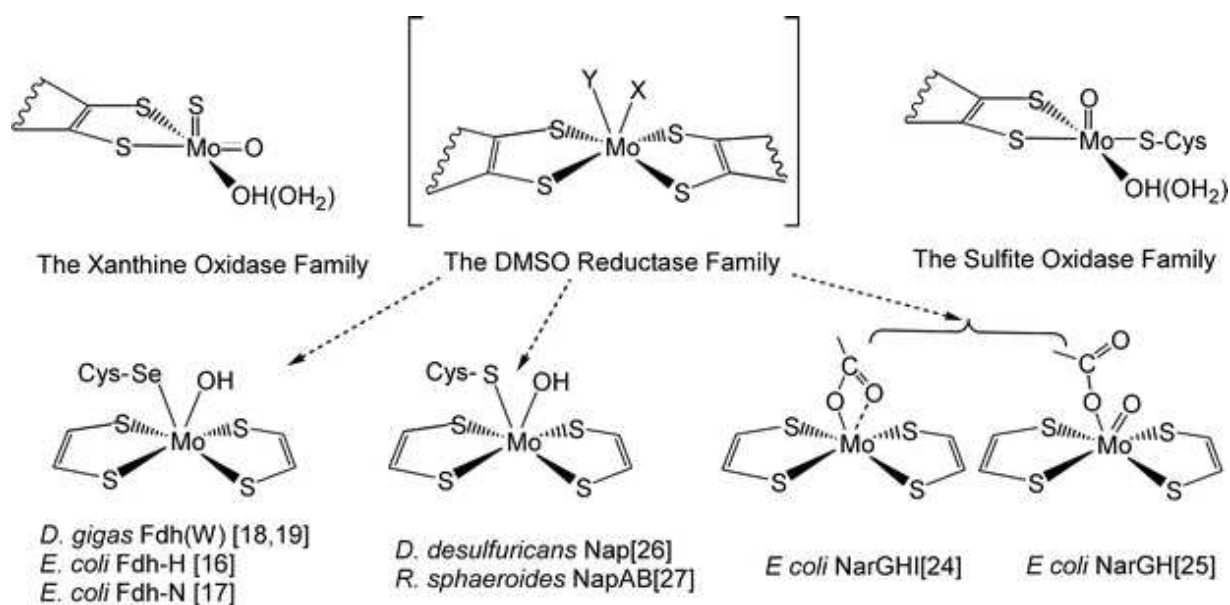


Figura 4. Schema della stereochemica dei centri Mo negli enzimi di riferimento (Johnson, 1996).

2 - Fisiologia Batterica e metabolismo microbico

E. coli K12 è uno dei batteri più studiati. Sapere già abbastanza sulla sua fisiologia ci fornisce indicazioni su quali aspetti sia o meno più opportuno indagare. Il suo sviluppo segue un modello di crescita classico, una volta inoculato il batterio in un terreno liquido, questo comincerà a produrre tutto ciò che gli è utile alla crescita in quell'ambiente.

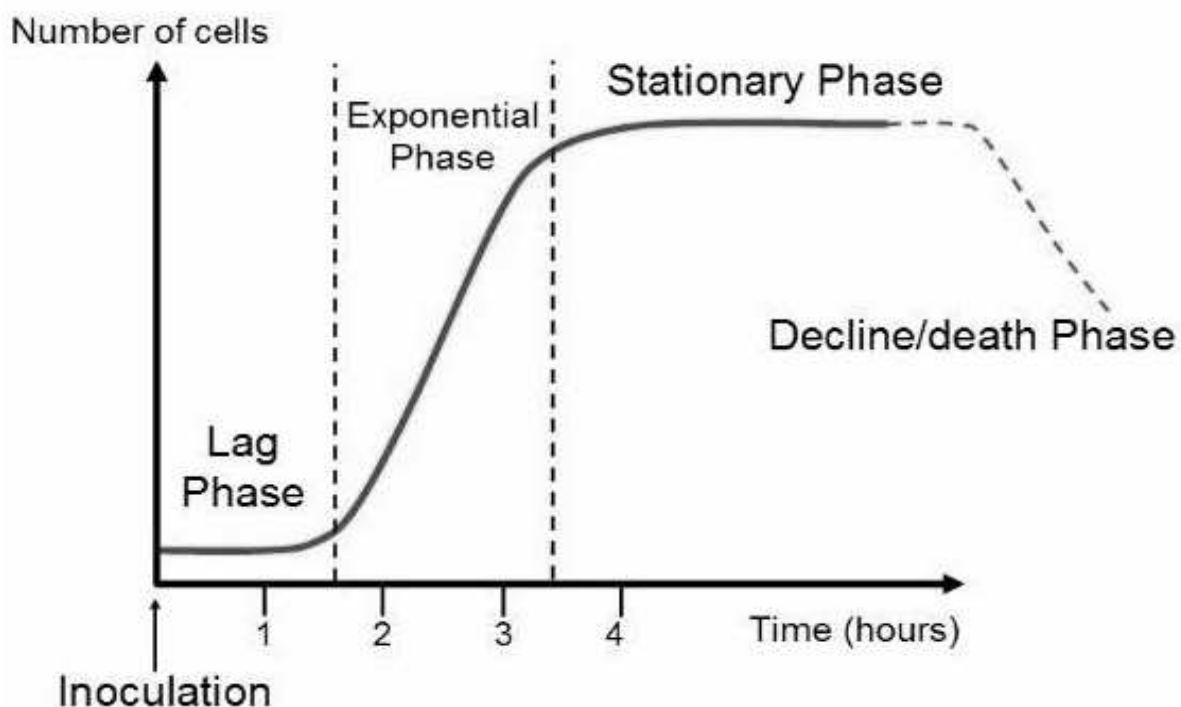


Figura 5. Grafico modello delle fasi di una curva di crescita microbica.

Riportando in un grafico il numero di cellule batteriche presenti nel terreno di crescita in funzione del tempo, si ottiene una curva di crescita in cui si osservano diverse fasi (Figura 5). La prima è una fase di adattamento che viene definita Lag, dove non c'è una crescita in termini di biomassa, quindi il numero della popolazione batterica rimane costante, ma si hanno una serie di adattamenti traduzionali e trascrizionali che sono la reale chiave per la colonizzazione dello spazio e il successivo utilizzo dei nutrienti. Quando l'assetto del batterio è ottimale cominciano le divisioni. Inizia quindi la fase Log. Questa fase è caratterizzata da

una crescita esponenziale dei batteri, saranno quindi al massimo i livelli di sintesi biologica ma al contrario della fase lag non si assiste all'innescio di nuovi pathway. Poiché sia i nutrienti che lo spazio sono fattori limitanti, la popolazione batterica dovrà fisiologicamente rallentare i cicli di duplicazione. Questo fenomeno è caratteristico della fase stazionaria, in questa fase i batteri continueranno a dividersi ma in termini di biomassa non ci sarà aumento in quanto i fattori spazio e nutrienti saranno responsabili della morte di un numero di batteri comparabile al numero di batteri generati nello stesso istante. Quando uno dei substrati avrà raggiunto delle concentrazioni troppo basse, i batteri dovranno cercare un sostituto metabolicamente valido. Nel caso in cui venga trovato, la popolazione si riorganizzerà adattando il metabolismo ed entrando in una nuova fase lag seguita da una seconda fase Log; questo tipo di curva che si verrà a formare è chiamata "Diauxica" (dal greco doppia crescita). Al contrario se la popolazione non avrà altri substrati disponibili per la crescita, andrà incontro ad una graduale riduzione del numero di cellule. Nei modelli teorici questa ultima fase è definita fase di decadimento o di morte. *E.coli* K12 prima che la coltura si estingua definitivamente adotta un'interessante strategia: chiamata *Growth Advantage in Stationary Phase* (GASP), che consiste nella formazione di aggregati, mirati al riciclo della biomassa, che consentono alla comunità di rimanere vitale per un lasso di tempo relativamente lungo (>5 anni), malgrado l'attività metabolica e il numero di cellule della popolazione si riducono di molto.

In realtà, in relazione ai substrati (gli zuccheri) sono stati sviluppati più modelli, con curve differenti dal modello descritto (Figura 6). Il modello "Diauxie" è all'origine della ricerca che ha portato Jacques Monod (1910–1976), François Jacob (1920–2013) e André Lwoff (1902–1994) a vincere il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina nel 1965 per la loro descrizione del primo modello di regolazione genetica. Diauxie è un termine coniato da Jacques Monod nel 1941 nella sua tesi di dottorato che si riferisce alla crescita microbica in

due fasi. Monod aveva mostrato interesse nello studio della crescita delle popolazioni batteriche utilizzando mezzi ricchi (Monod 1937). Durante il suo lavoro di tesi, valutò gli effetti sulla crescita batterica provocati dall'aggiunta di fonti di carbonio uniche, come glucosio o saccarosio in mezzi di crescita sintetici, (Monod 1941). Questi esperimenti gli permisero di calcolare con precisione quelli che chiamava *coefficients de croissance*, come la resa e il tasso di crescita. Nella prima pagina della sua tesi di dottorato, *Research on the Growth of Bacterial Cultures*, discussa il 17 dicembre 1941, ipotizzò infatti che la quantificazione matematica della crescita gli avrebbe ulteriormente permesso di andare oltre le sue aspettative e di identificare un nuovo fenomeno biologico: la crescita diauxica. Egli dimostrò che la crescita totale alla fine del primo ciclo variava sempre in proporzione alla concentrazione dello zucchero *A* (Glucosio) aggiunto alla coltura. Allo stesso modo, il secondo ciclo di crescita variava sempre in proporzione alla concentrazione dello zucchero *B* (Sorbitolo). Monod quindi concluse che lo zucchero *A* era completamente utilizzato durante il primo ciclo di crescita e solo successivamente lo zucchero *B* veniva utilizzato durante il secondo ciclo di crescita (Blaiseau and Holmes, 2021).

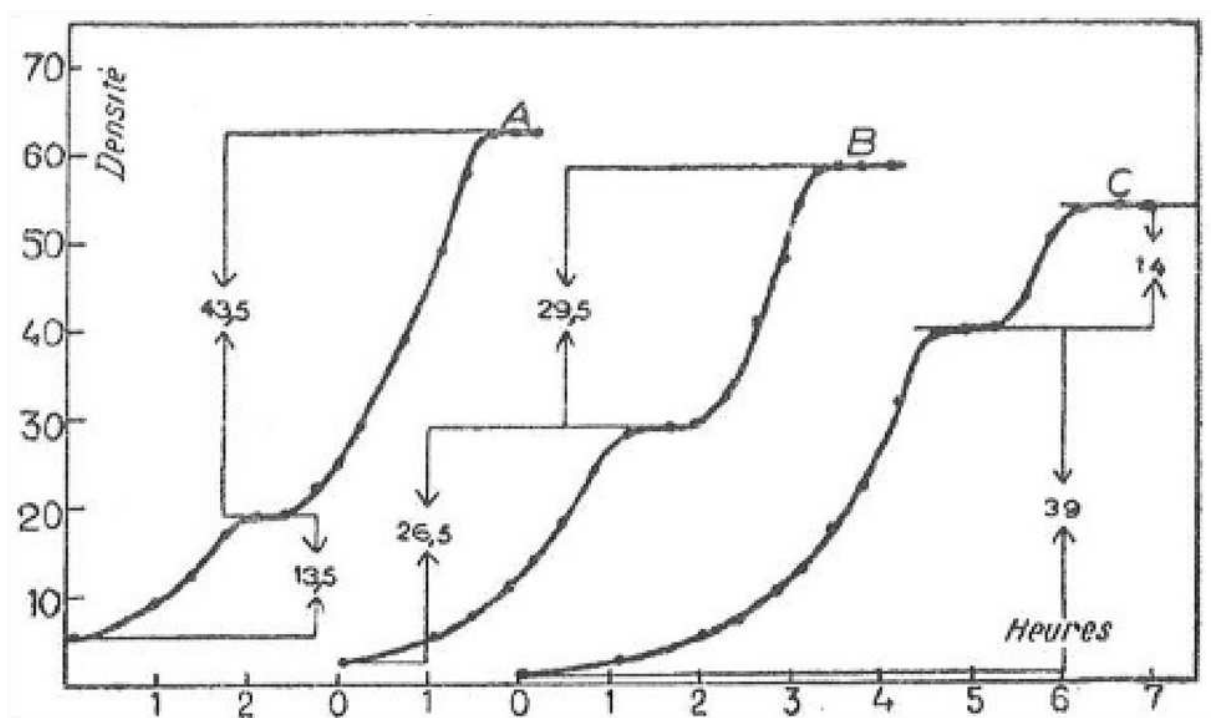


Figura 6. Grafico del consumo di substrato bifasico di Monod. Crescita di *Bacterium coli* (*E.coli* K12) in una miscela di glucosio-sorbitolo, nelle seguenti proporzioni 1/3 (*A*); 2/2 (*B*) e 3/1 (*C*) (Blaiseau and Holmes, 2021).

Monod dimostrò in modo conclusivo che uno zucchero *A* può sopprimere l'utilizzo per la crescita di uno zucchero *B* e solo quando lo zucchero *A* (più facilmente metabolizzabile) si esaurisce le cellule riadattano il proprio metabolismo per utilizzare il secondo zucchero, attivando una nuova via metabolica, (Blaiseau e Holmes, 2021). visibile come un plateau intermedio tra due fasi esponenziali della curva di crescita, chiamata da Monod crescita diauxica, da greco “doppia crescita”. La crescita diauxica è stata descritta per numerose coppie di zuccheri differenti, mostrando che il plateau intermedio è dovuto alla fase di espressione dei nuovi enzimi necessari per il consumo dello zucchero secondario.

Tabella 1. Metabolismo di *E.coli* K12.

<i>E.coli</i> K12 Metabolism	
1 glucose generates (total)	36-38 ATP
glycolysis yields	6-8 ATP
oxidation of pyruvate yields	6 ATP
Krebs cycle/e- transport yields	24 ATP
Number ATP to make 1 DNA chromosome	72,289,000
Number ATP to make 1 protein (360 aa)	1500
Number ATP to make 1 lipid	7
Number ATP to make 1 polysaccharide	2000
Number ATP to make 1 RNA (1000 nt)	6000
Number ATP to make 1 cell	55 billion ATP
Number Glucose molecules consumed	1.4 billion molecules
Cell division rate	1 division/30 minutes

2.1 - Fonti di Carbonio

Il carbonio come sappiamo è l'elemento su cui si evolve la vita sulla Terra, questo è infatti la componente strutturale principale della biomassa. Essendo d'importanza centrale per i processi di sintesi e per la produzione di energia, negli studi di fisiologia batterica si comincia spesso con lo studio dei sistemi che forniscono carbonio all'organismo. Oltretutto queste molecole sono quasi sempre i fattori che regolano e limitano la crescita. In *E.coli* K12 ci sono molti studi che determinano anche la gerarchia con cui il batterio sceglie prima un determinato zucchero piuttosto che un'altro.

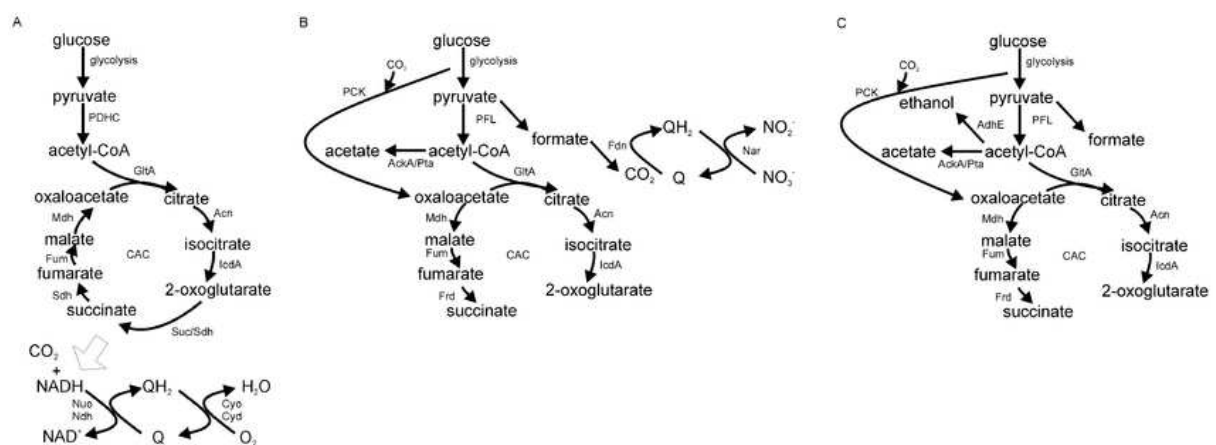


Figura 7. Le modalità metaboliche di *Escherichia coli*. Le principali vie del metabolismo del carbonio e dell'energia sono mostrate per (A) respirazione aerobica, (B) respirazione anaerobica (nitrato) e (C) fermentazione. In condizioni aerobiche il ciclo dell'acido citrico (CAC) è funzionale, mentre in condizioni anaerobiche opera la forma non ciclica. In condizioni aerobiche il glucosio può essere completamente ossidato a CO_2 e acqua. In condizioni anaerobiche in presenza di un accettore di elettroni alternativo, come il nitrato, il glucosio viene parzialmente ossidato a CO_2 e acetato. In condizioni di fermentazione anaerobica il glucosio viene convertito in acetato, etanolo e formiato e l'energia viene conservata mediante fosforilazione a livello di substrato piuttosto che mediante

fosforilazione ossidativa. Sono indicate le attività enzimatiche responsabili di ogni passaggio: AckA, acetato chinasi; Acn, aconitasi B; AdhE, alcool deidrogenasi; Cyd, citocromo bd ossidasi; Cyo, citocromo bo ossidasi; Fdn, formiato deidrogenasi-N; Fumo, fumarasi (A, B e C); GltA, citrato sintasi; IcdA, isocitrato deidrogenasi; Mdh, malato deidrogenasi; Nar, nitrato reduttasi; Nuo, NADH deidrogenasi I; Ndh, NADH deidrogenasi II; PCK, fosfoenolpiruvato carbossichinasi; PDHC, complesso piruvato deidrogenasi; PFL, piruvato formiato-liasi; Pta, fosfotransacetilasi; Sdh, succinato deidrogenasi; Suc, 2-ossoglutarato deidrogenasi/succinil-CoA sintetasi. complesso piruvato deidrogenasi; PFL, piruvato formiato-liasi; Pta, fosfotransacetilasi; Sdh, succinato deidrogenasi; Suc, 2-ossoglutarato deidrogenasi/succinil-CoA sintetasi. complesso piruvato deidrogenasi; PFL, piruvato formiato-liasi; Pta, fosfotransacetilasi; Sdh, succinato deidrogenasi; Suc, 2-ossoglutarato deidrogenasi/succinil-CoA sintetasi (Trotter et al., 2011).

Il glucosio, un metabolita fondamentale, è uno zucchero semplice con formula molecolare $C_6H_{12}O_6$ ed è il monosaccaride più diffuso, inoltre è la fonte di energia più significativa nel metabolismo energetico della maggior parte delle specie. In *E.coli* K12 le vie metaboliche dipendenti da questa molecola dipendono da pathway differenti e riguardano la respirazione aerobica, quella anaerobica e la fermentazione.

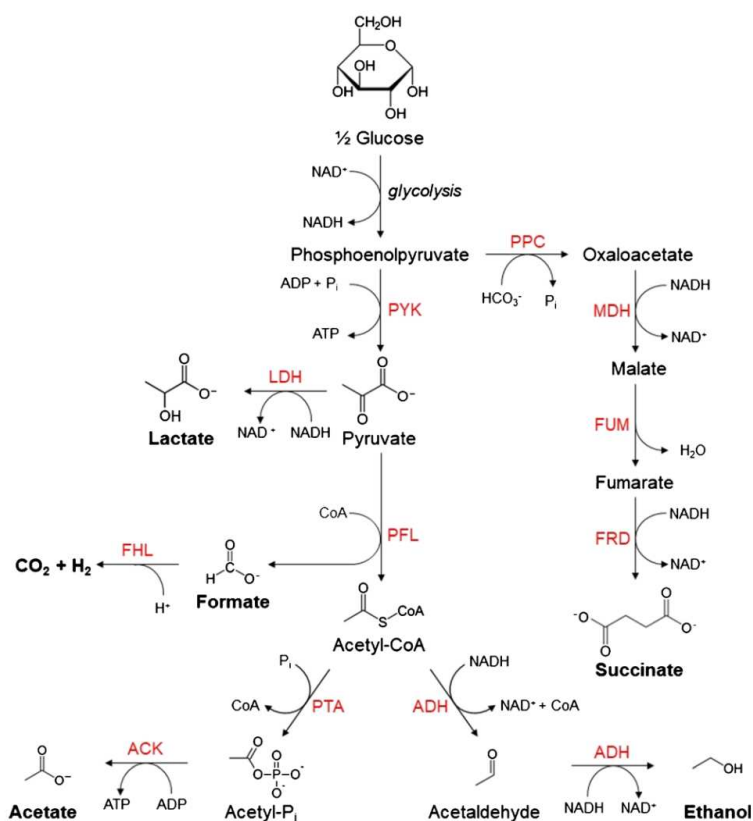


Figura 8. Vie di fermentazione di *E.coli* K12 a partire dal glucosio come fonte di carbonio. I prodotti finali sono indicati in grassetto. In rosso sono indicati gli enzimi responsabili di ogni passaggio: ACK, acetato chinasi; ADH, alcool deidrogenasi; FHL, formiato idrogenoliasi; FRD, fumarato reduttasi; LDH, lattato deidrogenasi; MDH, malato deidrogenasi; PFL, piruvato formiateliasi; PPC, fosfoenolpiruvato carbossilasi; PTA, fosfotransacetilasi; PYK, piruvato chinasi (Metcalf et al., 2020).

3 - Sistemi di respirazione

La respirazione è un processo esotermico, dove molecole nutrienti come il glucosio (o altri carboidrati) vengono degradate dalle cellule, tramite una catena di eventi, in molecole più semplici. In queste reazioni viene generata energia sotto forma di ATP.

E.coli K12 si serve di catene respiratorie costituite da 15 deidrogenasi primarie e da 10 reduttasi terminali, tra queste sono inclusi isoenzimi per alcuni dei donatori (H_2 , formiato, NADH e glicerolo-3-P) e accettori (O_2 e nitrato) di elettroni. Considerato che le deidrogenasi e le reduttasi terminali utilizzano i chinoni come substrato comune o mediatore redox, ciascuna delle deidrogenasi dovrebbe essere in grado di reagire con una qualsiasi delle reduttasi terminali. Solo la formiato idrogenasi può essere considerata un complesso di trasferimento di elettroni costituito da due enzimi che sono funzionalmente legati da subunità proteiche. I composti che fungono da donatori o accettori di elettroni hanno potenziali di riduzione differenti, che vanno da -0,43 V (formiato) a +0,03 V (succinato) per i donatori e da +0,82 V (O_2) a +0,03 V (fumarato) per gli accettori. come trasportatori di elettroni non proteici possono essere utilizzati tre diversi tipi di chinoni ubiquinone (UQ), menachinone (MK) e demetilmenachinone (DMK). Ciascun organismo sceglie un enzima o un altro sulla base della disponibilità di accettori e donatori, seguendo una sorta di “lista preferenziale”. Nei batteri anaerobi facoltativi, gli accettori di elettroni sono spesso usati in un ordine o gerarchia specifica. In *E.coli* K12 l' O_2 reprime tutte le vie respiratorie anaerobie e la fermentazione, mentre in condizioni anaerobiche il nitrato è l'accettore preferito e che va a reprimere altre vie anaerobie. La gerarchia è effettuata dalla regolazione trascrizionale delle corrispondenti reduttasi terminali da parte di O_2 e nitrato. L'uso preferenziale degli accettori elettropositivi è spiegato dai maggiori rendimenti energetici. Dal momento che con diversi accettori non solo le catene respiratorie ma anche il catabolismo complessivo, comprese le

vie centrali, possono essere modificate, l'uso degli accettori dovrebbe essere correlato ai valori $\Delta G^{0'}$ o alle rese di ATP delle vie corrispondenti. La correlazione di questi parametri con la sequenza con cui vengono utilizzati gli accettori supporta il significato normativo delle rese energetiche per i batteri (Uden and Bongaerts, 1997).

<i>E. coli</i>	E_m' (mV)	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol Glukose)	μ (h ⁻¹)	Sequence of use (‘Hierarchy’)
[H] → O ₂	+820	-2830	1.33	I
[H] → NO ₃ ⁻	+420	-858	0.58	II
[H] → Fumarate	+30	-550	0.21	III
[H] - - - - - Acetate	-	-218	-	III

<i>W. succinogenes</i>	E_m' (mV)	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol Glukose)	μ (h ⁻¹)	Sequence of use (‘Hierarchy’)
[H] → NO ₃ ⁻	+420	-168	0.4	II
[H] → DMSO	+160	-116	0.05	III
[H] → Fumarate	+30	-90	0.46	II
[H] → [S]	-270	-37	0.58	I

Figura 9. Regolazione delle vie respiratorie e della fermentazione in *E.coli* K12 da parte degli accettori di elettroni ('gerarchia'). [H]→accettore indica le varie catene respiratorie o reazioni redox in fermentazione. - indica la repressione trascrizionale del percorso da parte degli accettori di elettroni mostrati. E_m' fornisce i potenziali di punto medio degli accettori di elettroni. Per *E.coli* K12 $\Delta G^{0'}$ si riferisce alla crescita su glucosio più i rispettivi accettori, e le seguenti reazioni di crescita: glucosio + 6 O₂ → 6 CO₂ + 6 H₂O; Glucosio + 4 NO₃⁻ → 2 acetato⁻ + 4 NO₂⁻ + 2 HCO₃⁻ + 4 H⁺; Glucosio + 4 fumarato²⁻ → 2 acetato⁻ + 4 succinato²⁻ + 4 H⁺; Glucosio + H₂O → acetato⁻ + etanolo + 2 formiato⁻ + 3 H⁺. I tassi di crescita di *E.coli* K12 (μ) sono dati per la crescita su glicerolo con più accettori. L'uso gerarchico degli accettori è mostrato dai numeri I – III dove I è l'accettore preferito e III l'accettore meno preferito (Uden and Bongaerts, 1997).

Tabella 2. Ossidoreduttasi terminali e deidrogenasi primarie di *E.coli* K12 (Unden and Bongaerts, 1997). Il secondo substrato per ciascuno degli enzimi sono i chinoni che non sono dati. Le proprietà molecolari dei geni strutturali sono state ottenute dal database di *Escherichia coli* (*E.coli* K12 database EcoMap7 e EcoSeq7(Rudd, 2000)).

Enzima	Coppia reodx	$E'm$ (V)	Geni coinvolti
Deidrogenasi principali			
Formiato DH N	HCO_3^- / HCO_2^-	-0,43	<i>fdnGHI</i>
Formiato DH O	HCO_3^- / HCO_2^-	-0,43	<i>fdoGHI</i>
Formiato idrogeno-liasi			<i>fdhF</i> , <i>hycA</i> - <i>H</i>
Idrogenasi 1	$H + / H_2$	-0,42	<i>hyaABCDEFG</i>
Idrogenasi 2	$H + / H_2$	-0,42	<i>hybABCDEFG</i>
NADHDH I	$NAD + / NADH$	-0,32	<i>nuoA</i> - <i>N</i>
NADHDH II	$NAD + / NADH$	-0,32	<i>ndh</i>
Glicerolo-3-PDH O	DHAP/Gly-3-P	-0,19	<i>glpD</i>
Glicerolo-3-PDH N	DHAP/Gly-3-P	-0,19	<i>glpACB</i>
Piruvato ossidasi	acetato+CO ₂ /Piruvato		<i>poxB</i>
d -Lattato DH	piruvato/D-lattato	-0,19	<i>dld</i>
l -Lattato DH	piruvato/L-lattato	-0,19	<i>lctD</i>
d -Amminoacido DH	2-Ossoacido+NH ₄ ⁺ /Amminoacido		<i>DadA</i>
Glucosio deidrogenasi	glucosio/gluconato	-0,14	<i>gcd</i>
Succinato DH	fumarato/succinato	+0,03	<i>sdhCDAB</i>
Ossidoreduttasi terminali			
Chinolo ossidasi <i>bo</i>	O_2 / H_2O	+0,82	<i>cyoABCDE</i>
Chinolo ossidasi <i>bd</i>	O_2 / H_2O	+0,82	<i>cydAB</i>
Chinolo ossidasi III (Cyx)	O_2 / H_2O	+0,82	<i>appBC</i> (= <i>cyxAB</i>)
Nitrato reductasi A	NO_3^- / NO_2^-	+0,42	<i>narGHJI</i>
Nitrato reductasi Z	NO_3^- / NO_2^-	+0,42	<i>narZYWV</i>
Nitrato reductasi, periplasmatico	NO_3^- / NO_2^-	+0,42	<i>napFDAGHBC</i>
Nitrito reductasi	NO_2^- / NH_4^+	+0,36	<i>nrfABCDEFG</i>
DMSO reductasi	DMSO/DMS	+0,16	<i>dmsABC</i>
TMAO reductasi	TMAO/TMA	+0,13	<i>toCAD</i>
Fumarato reductasi	fumarato/succinato	+0,03	<i>frdABCD</i>

3.1 - Aerobiosi

L'espressione delle reduttasi terminali è regolata dal tipo di accettori di elettroni disponibili. L' O_2 è l'accettore di elettroni preferito e reprime le reduttasi terminali della respirazione anaerobica (García-Horsman et al., 1994). L' O_2 è regolato da un sistema a due componenti, costituito da un sensore di membrana (ArcB) e un regolatore di risposta (ArcA) (Tseng et al., 1996). ArcA è il principale regolatore del metabolismo aerobico e reprime i geni del metabolismo aerobico in condizioni anaerobiche. FNR è un regolatore citoplasmatico reattivo all' O_2 , con un dominio di legame del DNA con funzione sia sensoriale che regolatoria. FNR è l'omologo di ArcA per la respirazione anaerobica e le vie correlate. Le ossidasi terminali delle catene respiratorie aerobiche di batteri, che utilizzano l' O_2 come accettore di elettroni finale, possono ossidare in alternativa uno dei seguenti donatori di elettroni : un benzochinone, ubiquinone e due naftochinoni, menachinone e dimetilmenachinone.

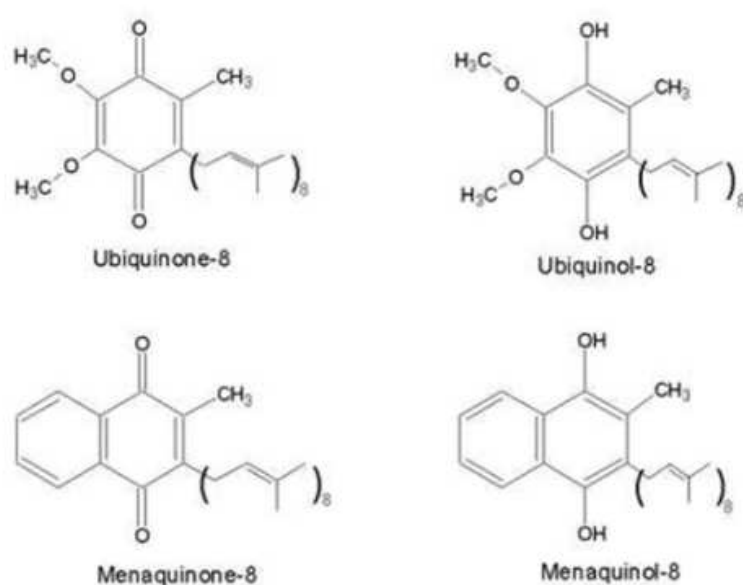


Figura 10. Strutture chimiche dei donatori di elettroni (Borisov, 2011).

Il genoma di *E.coli* K12 codifica 3 chinolo:ossigeno ossidoreduttasi: - citocromo bo (cyoABCD), citocromo bd-I (cydABX-cydH) e citocromo bd-II (appCBX). I tre enzimi costituiscono le principali ossidasi terminali nella catena respiratoria aerobica di *E.coli* K12. Gli enzimi target per l'aerobiosi sono quindi i citocromi. I chinoni invece sono molecole lipofile collocate all'interno del doppio strato lipidico della membrana citoplasmatica. La membrana di *E.coli* K12 contiene tre tipi di chinoni che hanno tutti una catena laterale ottaprenile (C 40). In *E.coli* K12, il citocromo bo contenente Cu, è sintetizzato a livelli massimi in condizioni di elevata disponibilità di ossigeno. Al contrario, i citocromi bd contenenti Fe predominano in condizioni di microaerofilia, mostrando una K_m molto bassa per l'ossigeno e una forza motrice protonica meno efficiente (Hay Mele et al., 2023). Questo suggerisce che la natura del cofattore metallico è cruciale nell'efficienza dei citocromi e nella loro affinità per l'ossigeno.

Sia il citocromo bo3 che il citocromo bd-I catalizzano l'ossidazione a due elettroni dell'ubichinolo-8 in ubichinone-8. L'ubichinone-8 è predominante durante la crescita aerobica, ma è sostituito dal menachinone-8 durante la transizione dall'aerobiosi all'anaerobiosi. Entrambe le ossidasi catalizzano l'ossidazione dell'ubichinolo-8 per consentire la respirazione cellulare con l'ossigeno come accettore di elettroni terminale. Le efficienze di conservazione dell'energia del citocromo bd-I ossidasi e del citocromo bo ossidasi sono diversi; il complesso del citocromo bd -I non pompa attivamente protoni, ma a causa dell'ossidazione del chinolo sul lato periplasmatico della membrana e del successivo assorbimento di protoni dal lato citoplasmatico della membrana, che vengono utilizzati nella formazione di acqua. La differenza di affinità per l'O₂ può essere riassunta anche con la definizione del rapporto di traslocazione protonico, che per il citocromo bd I ha una stechiometria $H^+/2e^-$ di 2, mentre per il citocromo bo si ha una stechiometria $H^+/2e^-$ di 4 (Bekker et al., 2009).

In *E.coli* K12 l'O₂ reprime tutte le vie respiratorie anaerobiche e la fermentazione, mentre il nitrato è l'accettore preferito in condizioni anaerobiche e reprime altre vie anaerobiche fermentative. Il modello (Figura 11) mostra gli stimoli (O₂, nitrato), i sensori (ArcB, NarX, NarQ), i regolatori della risposta (ArcA, NarL, NarP) e il sensore-regolatore del DNA citoplasmatico FNR.

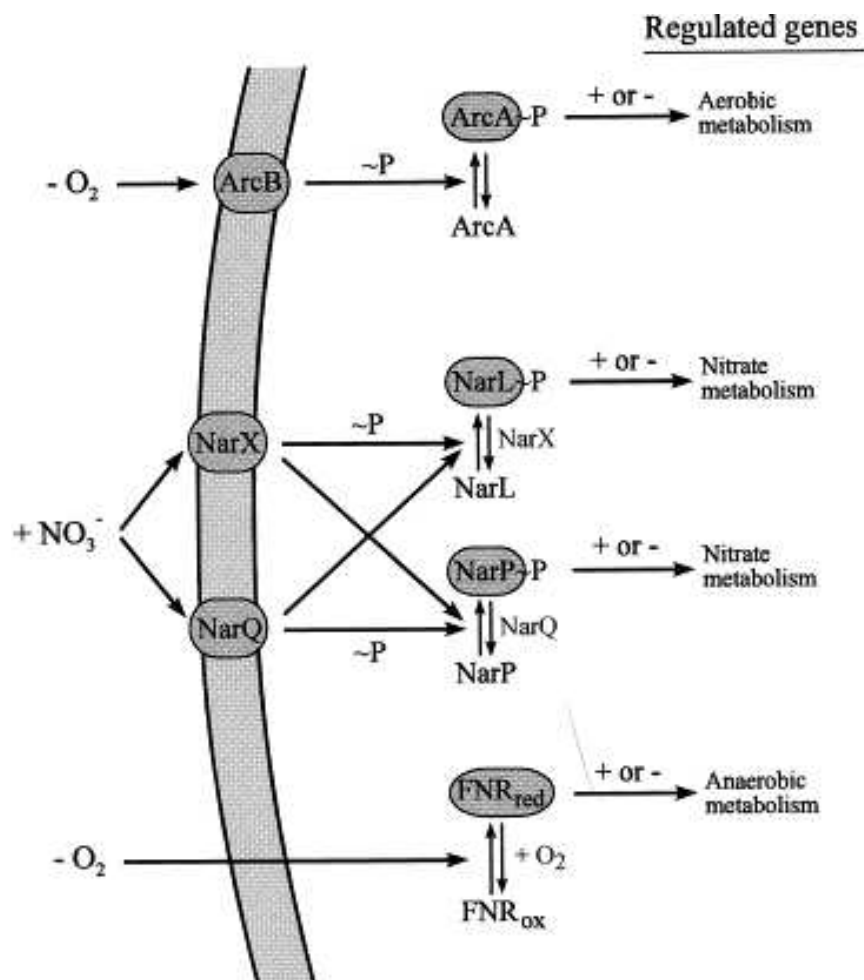


Figura 11. Pathway dei sistemi di controllo della respirazione di *E. coli* k12 (Unden and Bongaerts, 1997).

L'attivazione e la repressione dell'espressione del gene bersaglio è indicata da + o -. Per i regolatori della risposta vengono forniti gli stati fosforilati attivi (ArcA-P, NarL-P, NarP-P) e

le forme defosforilate inattive. Nella figura è mostrata quale proteina (sensoriale) agisce come chinasi e quale come fosfatasi dei regolatori della risposta. In presenza di nitrito rispondono gli stessi sensori (NarX, Q) e regolatori (NarL, P) del nitrato. Ma la fosforilazione di NarL da parte di NarX è bassa, con conseguenti basse concentrazioni di NarL-P in queste condizioni. Quindi con il nitrito, NarP-P è il principale regolatore; con il nitrato, NarL-P e NarP-P sono entrambi funzionali.

La gerarchia è effettuata dalla regolazione trascrizionale delle corrispondenti reduttasi terminali da parte di O₂ e nitrato. L'uso preferenziale degli accettori elettropositivi è spiegato dai maggiori rendimenti energetici. Dal momento che con diversi accettori non solo le catene respiratorie ma anche il catabolismo complessivo (comprese le vie centrali), può essere modificato, l'uso di accettori diversi dovrebbe essere correlato ai valori $\Delta G^{0'}$ o alle rese di ATP delle vie corrispondenti (Bader et al., 1999). Sia il citocromo *bo3* che il citocromo *bd* sono generatori primari di un gradiente transmembrana di potenziali H⁺ elettrochimici ($\Delta\mu H^+$), perché la reazione derivante dal trasferimento di equivalenti riducenti dal chinolo all'O₂ è accoppiata direttamente alla separazione delle cariche transmembrana. L'energia conservata sotto forma di $\Delta\mu H^+$ può essere utilizzata da *E.coli* K12 per la sintesi di ATP, il trasporto di nutrienti e altri scopi legati al metabolismo. Pertanto, la funzione principale di entrambe le ossidasi è la conservazione dell'energia. I due enzimi, tuttavia, sono diversi nelle loro efficienze bioenergetiche (rapporti di traslocazione protonica transmembrana, o numero di protoni rilasciati sul lato periplasmatico della membrana per elettrone [rapporto H⁺/e⁻]), con un rapporto H⁺/e⁻ pari a 2 per il citocromo *bo* e pari a 1 per il citocromo *bd*.

Un altro regolatore globale, FNR (un fattore di trascrizione labile all'ossigeno che regola centinaia di geni), controlla l'induzione dei processi anaerobici in *E.coli* K12. La proteina FNR ha un cluster Fe-S che funge da sensore redox (Cotter et al., 1997). I livelli della

proteina FNR sono simili sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, ma la proteina è attiva solo durante la crescita anaerobica. La proteina FNR attiva/reprime sia gli operoni *cyoABCDE* che *cydABX* durante la transizione a condizioni anaerobiche, fase che definiamo Microaerofilia (cioè, tensione di ossigeno inferiore al 2% della saturazione dell'aria) (Govantes et al., 2000).

3.1.1 - Citocromo *bo*3

Come già detto si tratta del citocromo con più bassa affinità per l'O₂. La struttura conferma che l'architettura complessiva di questo complesso è molto simile a quella di tutti gli altri membri della superfamiglia eme-rame ossidasi. L'intera proteina integrale contiene 25 eliche transmembrana, di cui la subunità I ne ha 15, la subunità II ne ha solo 2, la subunità III ne ha 5 e la subunità IV ha 3 eliche. Il citocromo *bo* è composto da quattro diverse subunità codificate dall'operone ABCDE. (Calhoun and Newton, 1991.).



Figura 12. Struttura PDB del citocromo *bo* PDB: 7N9Z EC: 7.1.1.3

3.1.2 - Citocromo *bd-I*

Abbiamo già parlato della differenza tra citocromo *bo* e citocromo *bd* in termini di rapporti di traslocazione protonica transmembrana, ossia il numero di protoni rilasciati sul lato periplasmatico della membrana per ogni elettrone [rapporti H^+/e^-] che nei citocromi *bo* è uguale a 4 mentre in quelli *bd* è uguale a 2. L'ossidazione dell'ubiquinolo rilascia due protoni nello spazio periplasmatico e due elettroni vengono trasferiti attraverso i cofattori dell'eme al sito di riduzione dell'ossigeno. Quattro protoni vengono reperiti dal citoplasma per la riduzione dell'ossigeno (Borisov et al., 2011). L'enzima è un etero-tetramero costituito dal dimero centrale di CydAB più due subunità transmembrana singole accessorie, CydX e CydH (Miller et al., 1988). La quantità di citocromo *bd* aumenta non solo a basse concentrazioni di ossigeno, ma anche in alcune condizioni sfavorevoli, come pH alcalino, temperatura elevata, presenza di disaccoppiatori-protonofori e basse concentrazioni di cianuro nei terreni di crescita. Questo citocromo inoltre non fa parte delle ossidasi terminali eme-rame in quanto non presenta atomi di rame al suo interno; contiene 3 emi legati: eme b 558, eme b 595 e eme d, presenti in un rapporto 1:1:1 (Miller and Gennis, 1983). La subunità I (CydA) contiene tutti e tre i cofattori dell'eme e l'anello di legame del chinolo esposto verso il periplasma (anello Q); l'eme b 558 funge da accettore primario di elettroni che vengono trasferiti all'eme b 595 e all'eme d che è il centro binucleare in cui l'ossigeno è ridotto ad acqua.

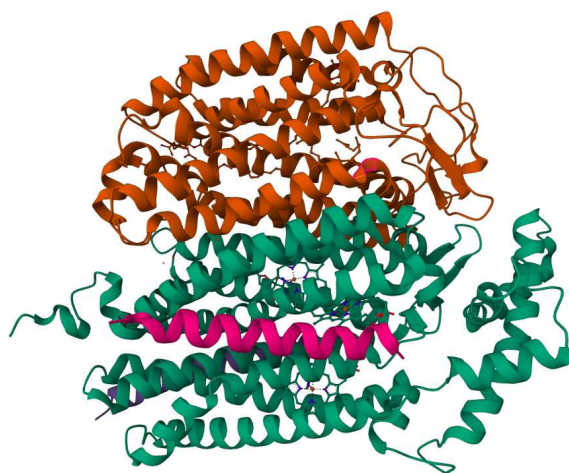


Figura 13. Struttura del citocromo *bdI* PDB: 6RKO EC:7.1.1.7

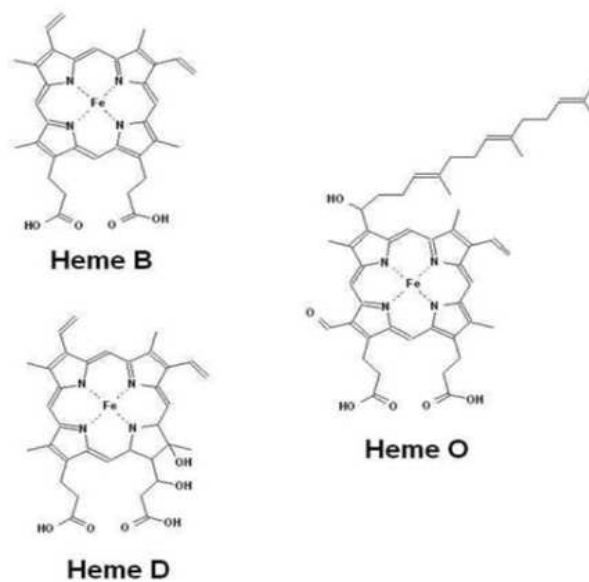


Figura 14. Struttura degli eme usati dai citocromi.

3.2 - Anaerobiosi

3.2.1 Respirazione anaerobia

Il nitrato (NO_3^-), che è relativamente abbondante in molti ambienti, ha tre funzioni nella fisiologia batterica. L'assimilazione del nitrato fornisce una fonte di ammonio per i processi di biosintesi; la respirazione del nitrato genera forza motrice protonica per la produzione di energia e infine la riduzione dissimilativa del nitrato permette l'ossidazione degli equivalenti riducenti in eccesso. In assenza di O_2 *E.coli* K12 può utilizzare il nitrato, come accettore finale di elettroni, convertendolo dapprima in nitrito e poi in ammonio. Per farlo deve necessariamente attivare i pathway di respirazione anaerobica e produrre le nitrato reduttasi.

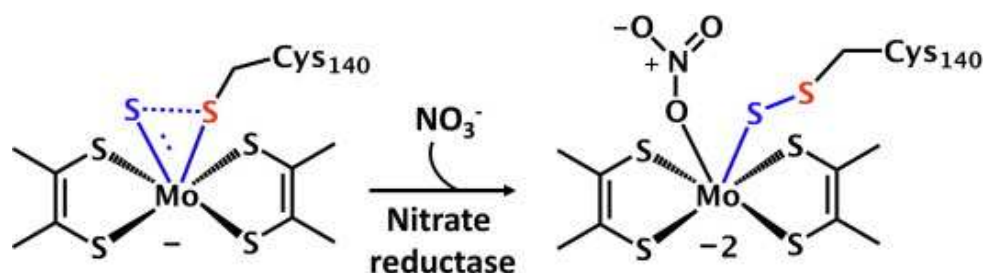


Figura 15. Stereochimica del meccanismo delle nitrato reduttasi

3.2.1.1 - NarGHI

Le nitrato reduttasi respiratorie (Nar) legati alla membrana, sono membri della famiglia degli enzimi PGD Mo/W- bis che catalizzano la riduzione del nitrato in nitrito associandola all'ossidazione dei chinoli, e generando la forza protonmotrice.

Il prototipo Nar, EcNarGHI è costituito da tre subunità: NarG porta il sito attivo Mo per la riduzione dei nitrati e un cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]$, NarH porta tre cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ e un cluster $[3\text{Fe}-4\text{S}]$; NarI è la subunità di membrana e porta due eme di tipo b che ossidano i chinoli. I

cluster ferro-zolfo formano una catena di relè per il trasferimento di elettroni dal sito di ossidazione del chinolo al Mo; sono numerati da 0 a 4 in base alla loro distanza dal sito Mo attivo.

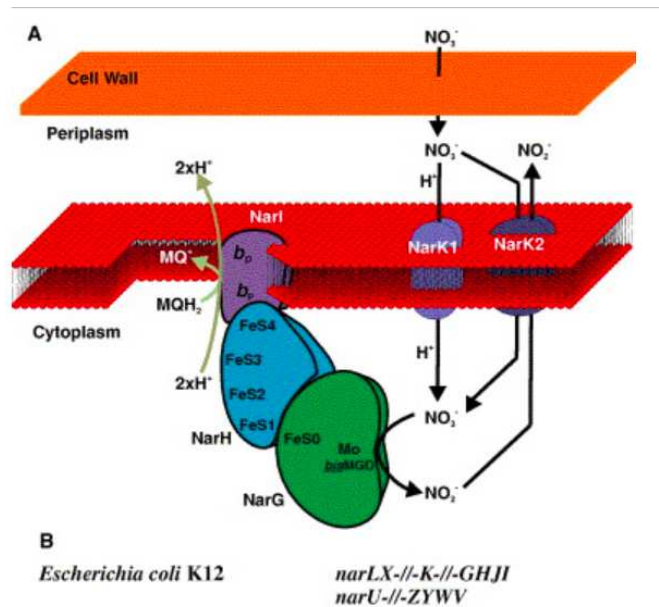


Figura 16. (A) Riduzione dei nitrati respiratori da parte degli enzimi Nar. (B) Organizzazione genica dei cluster di geni *nar* (González et al., 2006).

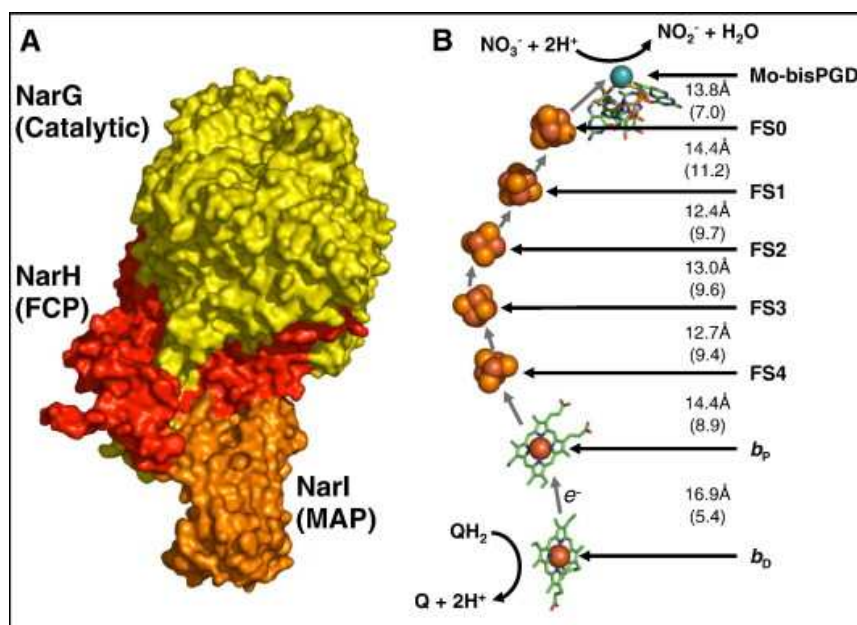


Figura 17. Struttura della NarGHI (Rothery et al., 2008)

La rimozione della subunità di membrana (NarI) abolisce completamente l'attività di ossidazione del chinolo, ma ha solo un effetto moderato sull'attività della nitrato reductasi (Ceccaldi et al., 2015).

Un molibdobis (piranopterin guanina dinucleotide) contenente una subunità catalitica che contiene anche un cluster $[4Fe-4S]$ è noto come FS0. Una subunità di trasferimento elettronico che tipicamente contiene quattro cluster di cubano $[Fe-S]$ noti come da FS1 a FS4 in sequenza che si allontanano dal Mobiscofattore PGD. Questa subunità è indicata come subunità della proteina a quattro cluster (FCP). Poiché sono in grado di catalizzare le interconversioni del substrato solubile in presenza di donatori o accettori di elettroni artificiali, le subunità catalitiche e FCP sono spesso indicate come dimero catalitico. Una proteina di ancoraggio della membrana (MAP) che può contenere o meno eme. La subunità MAP funziona sia per ancorare le subunità catalitiche e FCP alla membrana citoplasmatica sia per fornire al CISM un sito di legame chinolo/chinone redox-attivo.

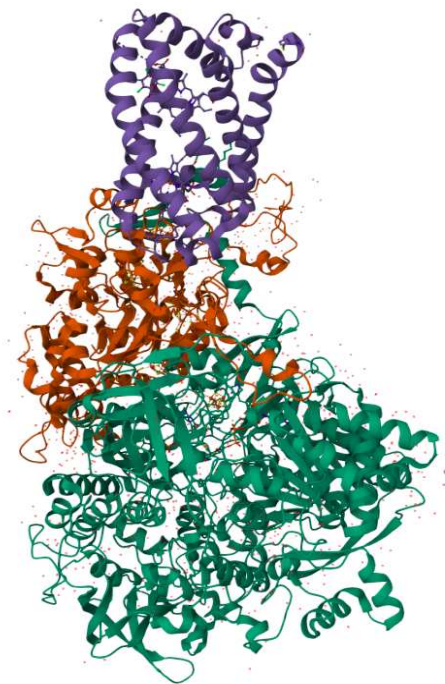


Figura 18. Struttura della NarGHI PDB: 1Y4Z EC:1.7.5.1.

3.2.1.2 - NapAB

La nitrato reduttasi legata alla membrana (enzima NarGHI; nitrato reduttasi A) impiega un ciclo redox per accoppiare l'ossidazione del chinolo con la traslocazione del protone, generando così la forza motrice del protone per la respirazione anaerobica (Stewart et al., 2002). NapAB è un complesso compatto idrosolubile costituito da una grande subunità catalitica (NapA; 91 kDa), contenente un cluster $[4Fe4S]$ e il cofattore del sito attivo del molibdeno (Moco), e da una piccola subunità di trasferimento di elettroni (ET) (NapB; 17 kDa), che ospita due eme di tipo c esposti in superficie. Catalizza la prima fase della denitrificazione in condizioni sia aerobiche che anaerobiche (Bertrand et al., 2007). Il complesso Nap viene utilizzato dalla cellula per supportare il metabolismo anaerobico come alternativa al percorso Nar quando la concentrazione di nitrati è bassa nel terreno di coltura (Wang et al., 1999) (González et al., 2006).

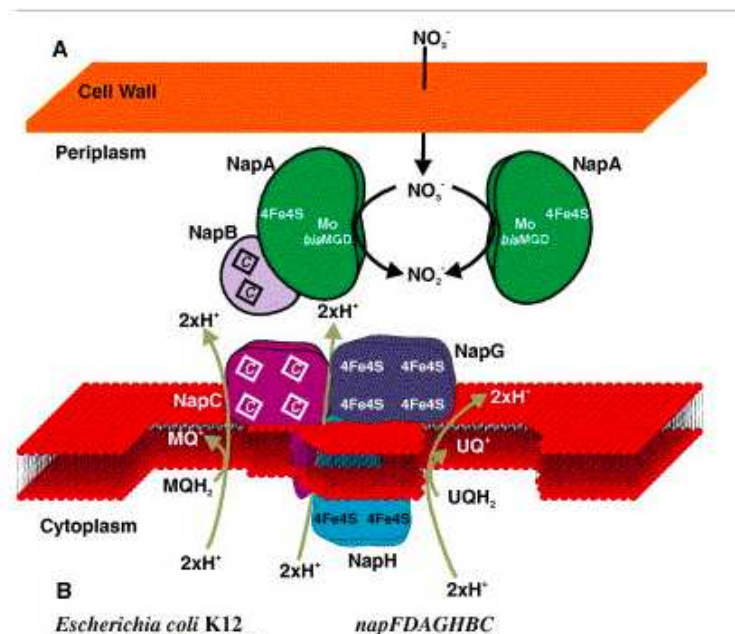


Figura 20. (A) Riduzione dissimilativa dei nitrati da parte degli enzimi Nap. (B) Organizzazione genica dei cluster genici *Nap* (González et al., 2006).

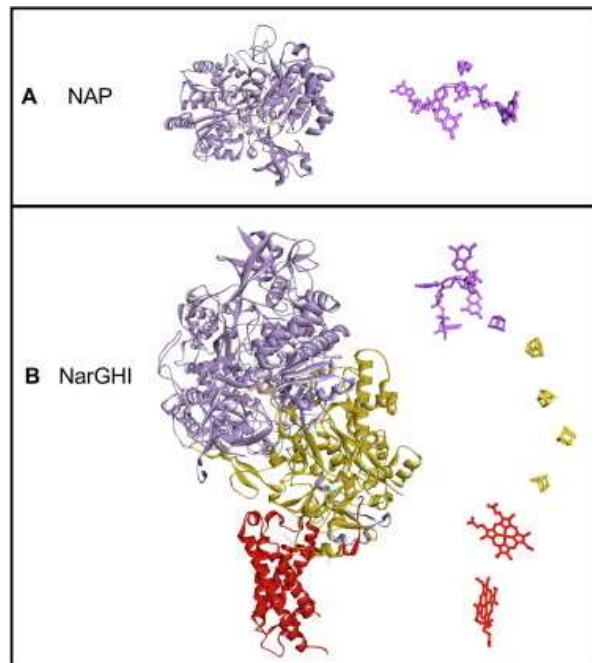


Figura 16. Struttura delle nitrato reduttasi (a sinistra) con cluster metallici evidenziati (a destra). Il pannello A mostra la struttura di una nitrato reduttasi periplasmatica, NapA, contenente un cluster [4Fe-4S] e un Mo-MGD grappolo (PDB 2V3V). Il pannello B mostra la struttura di NarGHI, una nitrato reduttasi da *E.coli* K12, un complesso legato alla membrana rivolto verso il citoplasma, dove NarG è rappresentata in viola, NarH in oro e NarI in rosso (PDB 3IR5). A destra del complesso sono mostrati in rosso i due cluster dell'eme b della subunità NarI, in oro [3Fe-4S] e [4Fe-4S] cluster di NarH e in viola un cluster [3Fe-4S] e un cluster Mo-bisMGD di NarG (Sousa et al., 2020).

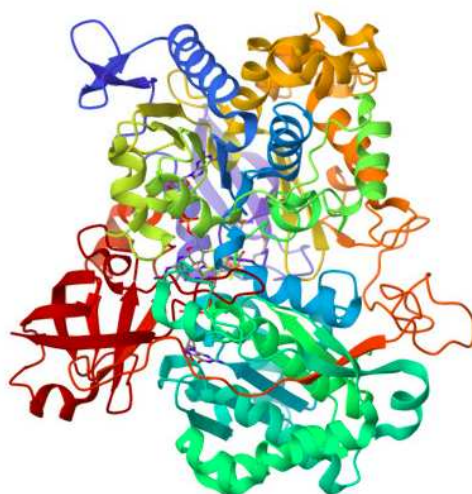


Figura 21. Struttura Nap di *E.coli* K12 PDB: 2NYA EC:1.9.6.1.

3.2.3 - Fermentazione

In condizioni di anaerobiosi e in assenza di accettori di elettroni alternativi *E. coli* converte gli zuccheri in una miscela di prodotti mediante fermentazione. I principali prodotti solubili sono acetato, etanolo, lattato e formiato, con quantità minori di succinato. Inoltre, i prodotti gassosi, idrogeno (H) e anidride carbonica (CO₂) sono prodotti in quantità sostanziali. Il percorso che genera i prodotti di fermentazione è ramificato e il flusso lungo ogni ramo varia in risposta al pH del terreno di coltura e alla natura del substrato di fermentazione.

La quantità di NADH da riciclare varia in base alla natura del substrato, così come la composizione della miscela dei prodotti di fermentazione. Gli esosi come il glucosio o il fruttosio, producono 2 molecole di NADH per ogni molecola di esoso convertita in piruvato, mentre gli esitoli (ad es. sorbitolo o mannitolo) producono 3 NADH per ogni molecola. Al contrario, i derivati dello zucchero più ossidati come gli acidi esonico ed esuronico producono meno di 2 NADH per ogni molecola a 6 atomi di C fermentata. Per ottenere un corretto equilibrio di fermentazione è necessario far corrispondere il NADH prodotto con il

NADH consumato attraverso l'escrezione dei prodotti di fermentazione. In pratica *E.coli* K12 utilizza una miscela di etanolo, lattato e acetato, che consumano quantità diverse di [H] per C6 . Variando le proporzioni di questi è possibile adeguare il substrato, ottenendo così un equilibrio redox. *E. coli* è in grado di effettuare due tipi diversi di fermentazione: la fermentazione lattica e la fermentazione alcolica. I due tipi di fermentazione differiscono, oltre che per gli enzimi utilizzati nel processo, rispettivamente lattato deidrogenasi (LDH) e AcetilCoA-deidrogenasi (ACDH) e Alcol deidrogenasi (ADH), anche per i prodotti della reazione che nel caso della fermentazione lattica è il lattato, mentre nella fermentazione alcolica è l'etanolo (Clark, 1989).

4. Obiettivi

Questa tesi si contestualizza come parte di un progetto che ha come scopo evidenziare la coevoluzione di biosfera e geosfera andando a studiare le possibili correlazioni tra la composizione chimica dell'ambiente e la crescita di una popolazione microbica su di esso. Nello specifico, abbiamo creato un modello sperimentale usando il batterio *Escherichia coli* k12 DH5 alpha, cercando di indagare sui criteri che portano il microorganismo a scegliere di usare una specifica strategia metabolica, sulla base di alterazioni indotte nelle concentrazioni di specifici ioni metallici nel mezzo di coltura.

Volendo testare nel modo più diretto possibile la relazione tra metalli e microrganismi, abbiamo costruito i nostri esperimenti sulla base di una classe di proteine indispensabili per i batteri, le ossidoreduttasi terminali delle catene respiratorie. Andando ad alterare le concentrazioni degli elementi metallici in traccia coinvolti o facenti parte della struttura di questi enzimi. Per questo studio è stato quindi necessario raccogliere dati in condizioni di crescita differenti andando a modulare i parametri del sistema di crescita (pH, Temperatura, % di O₂ in fase) in modo da innescare il metabolismo voluto (l'aerobiosi o l'anaerobiosi). In aerobiosi gli enzimi di riferimento sono i citocromi che usano il Rame (Cu) e il Ferro (Fe), mentre in microaerofilia e anaerobiosi si hanno le nitrato reduttasi che si servono di Ferro (Fe) e Molibdeno (Mo).

Un'ipotesi è quella che cambiando la composizione metallica di partenza dei terreni in cui cresce il batterio dovremmo *in primis* notare una differenza tra modelli con o senza metalli. Una seconda ipotesi è quella che nei sistemi di crescita chiusi, dove si passa dall'aerobiosi alla microaerofilia, terminando con la completa anaerobiosi, usando terreni con l'aggiunta di elementi in traccia, ci aspettiamo che l'attivazione dei pathway anaerobici di respirazione del nitrato e poi di fermentazione, siano facilitati. Chiaramente ognuno dei metalli citati non ha

implicazioni unicamente con questi enzimi, ma anzi un lavoro di verifica su tutti i pathway biologici influenzati e sulla cinetica dei trasportatori metallici valutando l'espressione proteica, porterebbe sicuramente a nuove considerazioni di varia natura sul tema.

5. Materiali e metodi

5.1 - Ceppi batterici e condizioni di crescita

5.1.1 - *Escherichia coli* k12 DH5alpha

Escherichia coli K12 DH5alpha è un batterio mesofilo della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il batterio è un Gram-negativo a forma di bastoncino ed è lungo pochi micron e largo 0,5 micron, aerobio e anaerobio facoltativo, non sporigeno e termotollerante (cresce anche a temperature di 44,5 °C rispetto ad altri coliformi), è un lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano, e beta-D-glucuronidasi-positivo. Come tutti i procari, è sprovvisto di membrana nucleare. Il citoplasma della cellula contiene una singola molecola di DNA circolare a doppio filamento. La cellula cresce rapidamente su terreni semplici (tempo di generazione dell'ordine di 1 ora) e si riproduce per fissione binaria. La sua capacità di crescere sia in sistemi aerobici tramite ossidazione, che anaerobici tramite fermentazione, lo rende un organismo molto adatto alla sua nicchia ecologica primaria, che è l'intestino dell'uomo e di altri animali, dove è quasi sempre un normale componente della flora.

Escherichia coli K12 DH5alpha è uno dei batteri modello più utilizzati in laboratorio per esperimenti di fisiologia microbica e per studiare la connessione tra genotipo e fenotipo al variare delle condizioni di crescita. Il suo genoma è stato sequenziato più volte, e sono disponibili dettagliate mappe del suo metabolismo e dei *master regulators* utilizzati per modificare i pathway metabolici.

5.1.2 - Protocollo di crescita del batterio

Il batterio è stato conservato in stub_{MB} in criotubi a -80°C come master bank e sono stati creati degli stub_{WB} addizionali come working bank dai quali per ciascuna crescita veniva portato su piastra e riportato in condizioni vitali ottimali. Il trasferimento avveniva sempre con semina immediata su piastra petri con terreno Tryptone-Yeast extract (TY) agar in condizioni di sterilità tramite anse sterili in plastica. Dopo l'incubazione overnight, in incubatore statico a 37°C , è stata valutata la crescita delle colonie e ne sono state selezionate alcune. Le colonie sono state trasferite in terreno TY liquido in un volume di 2 ml in provette Falcon da 15 ml e lasciate a crescere in agitazione overnight sempre a 37°C . A questo punto è stato effettuato un subinoculo delle colture in un volume di 10 ml di TY e sono state lasciate in incubazione nelle stesse condizioni overnight. Le colture dovevano essere pre-adattate al terreno minimo, quindi aliquote delle colture cresciute in TY sono state inoculate in 15 ml di terreno minimo M9 (le proporzioni da inoculare sono state calcolate in modo da ottenere una brodocoltura con valori di assorbanza a $\lambda=600$ pari a 0.1) e sono state lasciate in agitazione a 37°C overnight.

L'inoculo delle colture nei vari sistemi è stato effettuato in modo da ottenere una OD_{600} iniziale di 0.1.

5.2 - Terreni e Vetreria

Il terreno usato per la prima semina da stub_{WB} è stato il (TY) a base di triptone ed estratto di lievito che è un terreno ricco nel quale il batterio senza limitazione alcuna riprende vitalità molto velocemente.

Tabella 3. Composizione del terreno TY (DSMZ medium 1143).

Composto	Concentrazione (g/L)
Tryptone	5.0
Yeast extract	3.0
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.9
Adjust to pH 6.8	

Il terreno usato per i nostri esperimenti è stato l'M9, un terreno minimo che ci ha permesso di correlare in maniera univoca la risposta del batterio alle alterazioni di singoli parametri come l'incremento/decremento della crescita al variare delle concentrazioni metalliche.

Tabella 4. Composizione del terreno definito M9 usato per gli esperimenti di crescita (DSMZ 382).

382: MINERAL MEDIUM M9 for <i>E.coli</i> K12 JM strains	
10 x M9 salts (per l)	100.00 ml
MgSO ₄ (1 M)	1.00 ml
CaCl ₂ (0.1 M)	1.00 ml
Thiamine-HCl x 2 H ₂ O (filter-sterilized, 1 M)	1.00 ml
Glucose (20%)	10.00 ml
KNO ₃	2.00 ml
Distilled water	900.00 ml

1. The above solutions should be sterilized separately by filtration (thiamine, glucose) or autoclaving.
2. Adjust pH to 7.4.
- 3 lo stock di KNO₃ presenta una concentrazione 1M

10 x M9 salts (per l)	
Na ₂ HPO ₄	60.00 g
KH ₂ PO ₄	30.00 g
NH ₄ Cl	10.00 g
NaCl	5.00 g

Gli elementi in traccia sono stati aggiunti usando delle soluzioni stock di elementi in traccia (soluzione SL-10 del terreno DSMZ 320).

Tabella 5. Soluzione SL-10 di elementi in traccia, parte del terreno di coltura per *Clostridium cellulovorans* (DSMZ 320).

Trace element solution SL-10 (from medium 320)	
HCl (25%)	10.00 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1.50 g
ZnCl ₂	70.00 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100.00 mg
H ₃ BO ₃	6.00 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190.00 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2.00 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24.00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36.00 mg
Distilled water	990.00 ml

Per le colture sono state utilizzate beute in vetro da 250 ml nei sistemi Aerobici e flask in vetro da 120 ml con tappo perforabile e chiusura ermetica tramite crimpatrice per i sistemi anaerobici. La vetreria utilizzata per effettuare gli esperimenti è stata, inoltre, pretrattata per eliminare le tracce di metalli presenti all'interno, in modo tale da non avere interferenti nei risultati.

Il trattamento utilizzato per eliminare le tracce di metalli dalla vetreria e plastiche utilizzate si componeva di vari step:

- overnight in acqua deionizzata e sapone;
- risciacquo del materiale con acqua deionizzata;
- trattamento di tutto il materiale precedentemente lavato e risciacquato con HCl 0.5 M overnight;
- risciacquo del materiale con acqua ultrapura;
- asciugatura sotto cappa chimica.

L'analisi con spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è stata utilizzata per valutare i livelli di metalli in traccia rilasciati dai contenitori nel terreno di coltura dopo aver effettuato questa procedura di lavaggio. Il terreno rivelava livelli molto bassi e rappresentava dunque il nostro “bianco” per gli esperimenti .

5.3 - Glucosio

Il carbonio essendo di importanza centrale per la sintesi e per la produzione di energia è stato fornito in quantità abbondante (0.2%) in modo da evitare l'attivazione di altre vie metaboliche. La valutazione è stata eseguita tramite saggio enzimatico (in collaborazione con il Prof. Strazzulli dell'Università “Federico II” di Napoli) e i dati sono stati riportati in mg/ml e poi trasformati in percentuale.

5.4 - Ossigeno e Temperatura

Nei sistemi di coltura in aerobiosi l'ossigeno è stato mantenuto in equilibrio con le concentrazioni atmosferiche tramite agitazione a 180 rpm e temperatura a 37 °C. Per il monitoraggio nei sistemi di crescita anaerobici in liquido, sono stati usati degli sensori ottici (PreSense, Germany) fissati all'interno delle flask in agitazione. Le letture della % di O₂ in fase sono state effettuate tramite Fibox 4 trace che è un misuratore di ossigeno autonomo progettato dalla PreSense (Germany), si serve di una sonda a fibra ottica, che puntata sull'esterno delle flask in direzione dei sensori ci trasmette il dato. Lo strumento deve in precedenza essere settato in base alla temperatura, questa veniva preimpostata in una camera calda a 37 °C e monitorata tramite un termometro digitale con trasmissione bluetooth. Fibox 4 trace può funzionare con sensori tipo PSt3 (limite di rilevamento 15 ppb ossigeno disciolto, 0 – 100 % ossigeno), tipo PSt6 per il campo di traccia ossigeno (limite rilevamento 1 ppb ossigeno disciolto, 0 – 5 % ossigeno) e anche con tipo PSt9 per misurazioni di ossigeno ultrabasso (limite di rilevamento 0,5 ppmv, 0 - 200 ppmv ossigeno gassoso). Per gli esperimenti sono stati usati sensori tipo PSt6.

5.5 - Nitrato

Dopo l'ossigeno, il nitrato è il secondo accettore di elettroni fornito all'interno dei nostri sistemi di crescita ed il suo monitoraggio ci fornisce una mappa temporale sulle cinetiche di attivazione delle nitrato riduttasi e in generale sull'induzione della fase di respirazione anaerobica. Le concentrazioni di nitrato residuo all'interno dei mezzi esausti sono state ottenute tramite spettrometria di massa accoppiata a cromatografia a scambio ionico (IC-MS). Per la cromatografia i campioni sono stati processati seguendo la Standard Operating

Procedure (SOP) (Correggia et al., 2023). Preparazione del campione: di ciascun campione è stata controllata la conducibilità, nel caso in cui il valore ottenuto fosse fuori del range di accuratezza dello strumento, venivano effettuate diluizioni. La conducibilità iniziale doveva essere di circa 500-600 $\mu\text{S}/\text{cm}$. I campioni sono stati trasferiti per le analisi in provette Falcon da 15 mL etichettate, previo filtraggio (0,22 μm). Il volume finale del campione doveva essere di 10 mL (5 mL per gli anioni e 5 mL per i cationi).

5.6 - Determinazione del pH

L'acidificazione del terreno è stata monitorata per vedere in modo indiretto se l'organismo cominciava a produrre acidi organici, per sapere quando la coltura entrava in fase di fermentazione. Per il monitoraggio abbiamo usato come indicatore di viraggio del pH, il blu bromotimolo. Questo indicatore è molto adatto al range di acidificazione di *E.coli* K12 che va da 7.4 a 5.5. Dapprima è stata creata una retta di taratura standard sul range di pH tra 8 e 5 usando il terreno M9, che ha consentito di stabilire che ad una riduzione del pH corrisponde una riduzione dell'assorbanza. Per i valori più alti è stato valutato il terreno senza inoculo, mentre per generare acidità è stato aggiunto HCl (25%). Successivamente sono stati analizzati i triplicati biologici dei campioni di sovrinatante dei vari sistemi di crescita, privati della componente cellulare tramite centrifugazione a 4000 rpm x 7min e filtrazione a 0,22 μm . La valutazione colorimetrica è stata effettuata tramite spettrofotometria ad una lunghezza d'onda di 620 nm.

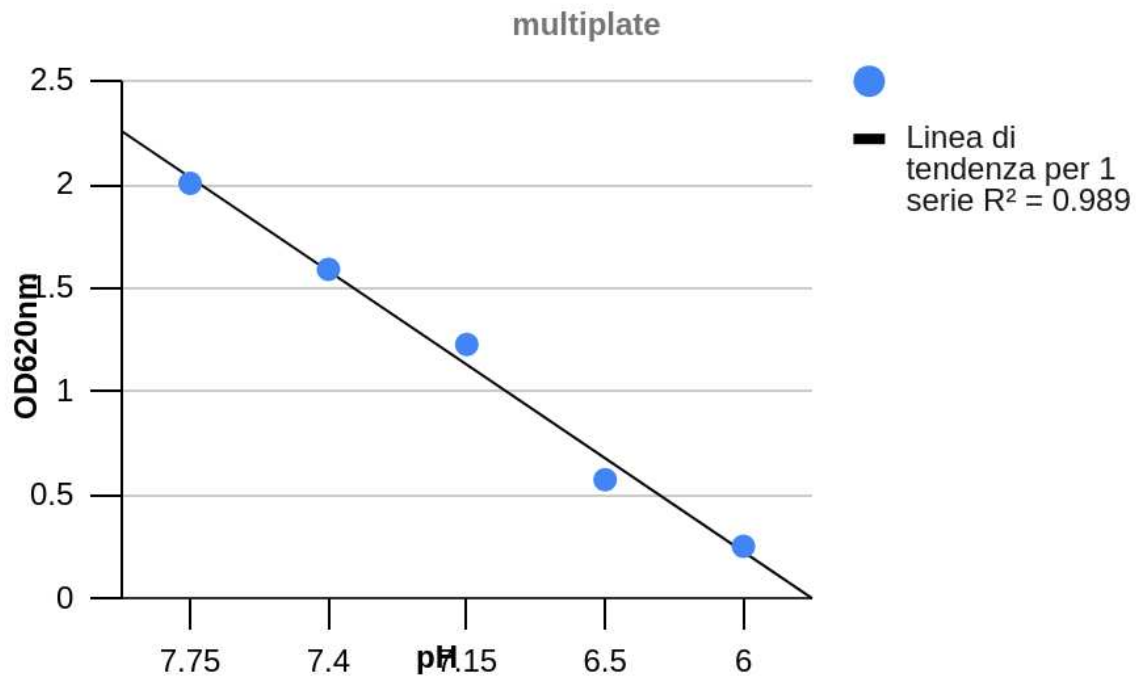


Figura 22. retta di taratura per il pH in multiplate

5.7 Determinazione della crescita

La crescita delle colture è stata valutata tramite spettrofotometria a 600 nm (OD_{600}). In dettaglio, il tasso di crescita è stato valutato ogni due ore, in triplicato. La curva di crescita è stata ottenuta per ogni condizione riportando in grafico semilogaritmico la media dei valori ottenuti di densità cellulare ($\text{Log } OD_{600}$) in funzione del tempo (ore).

5.8 Estrazione delle proteine

Per la lisi cellulare, l'estrazione delle proteine totali e la quantificazione delle proteine con il dosaggio delle proteine BCA è stato ottimizzato un protocollo, che si descrive di seguito.

Procedura di lisi cellulare

1. La coltura di 50 ml standardizzata ad una densità ottica pari a 2 di *E.coli* K12 cresciuta overnight è stata centrifugata per 30' a 7500 rpm
2. Il surnatante è stato scartato ed il pellet è stato conservato;
3. Al pellet cellulare sono stati aggiunti 5 ml di tampone di lisi e 50 µl di uno stock 100x contenente inibitori di proteasi ed è stato risospeso;
4. Sono stati eseguiti 3 cicli di congelamento/scongelamento (-80°C/+75°C) fino al completo congelamento/scongelamento del campione;
5. Il campione è stato congelato in ghiaccio secco;
6. Il campione è stato sonicato per 20' (30" ON, 30" OFF) con una sonda macro ad ampiezza del 40% mantenendo il campione in ghiaccio secco e acqua [ND: dopo la sonicazione il campione passa da torbido a limpido];
7. Il campione è stato centrifugato per 30' a 9000 rpm;
8. Il surnatante è stato trasferito in una provetta Falcon da 15 ml e il pellet di detriti cellulari è stato scartato.

Tabella 6. Soluzione buffer di lisi

Soluzione Buffer di lisi Concentrazione pH		
Tris HCl	150 mM	pH 8
NaCl	50 mM	
Urea	6 M	
EDTA	10 mM (stock solution 200 mM)	
SDS	2% (stock solution 20%)	
DTT	10 mM (stock solution 1 M)	
- Soluzione BSA 2 mg/ml nel Buffer di Lisi		
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)		

Procedura di quantificazione delle proteine

- Sono state seguite le linee guida della casa produttrice per la preparazione della soluzione BCA e della BSA (albumina) per la curva standard (Figura 22);
- In ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti sono stati aggiunti 200 µl di soluzione BCA e 25 µl di standard o campione.
- Il pozzetto è stato incubato per 30' a 37°C.
- Sono state effettuate letture delle piastre in un lettore di micropiastre a 562 nm.

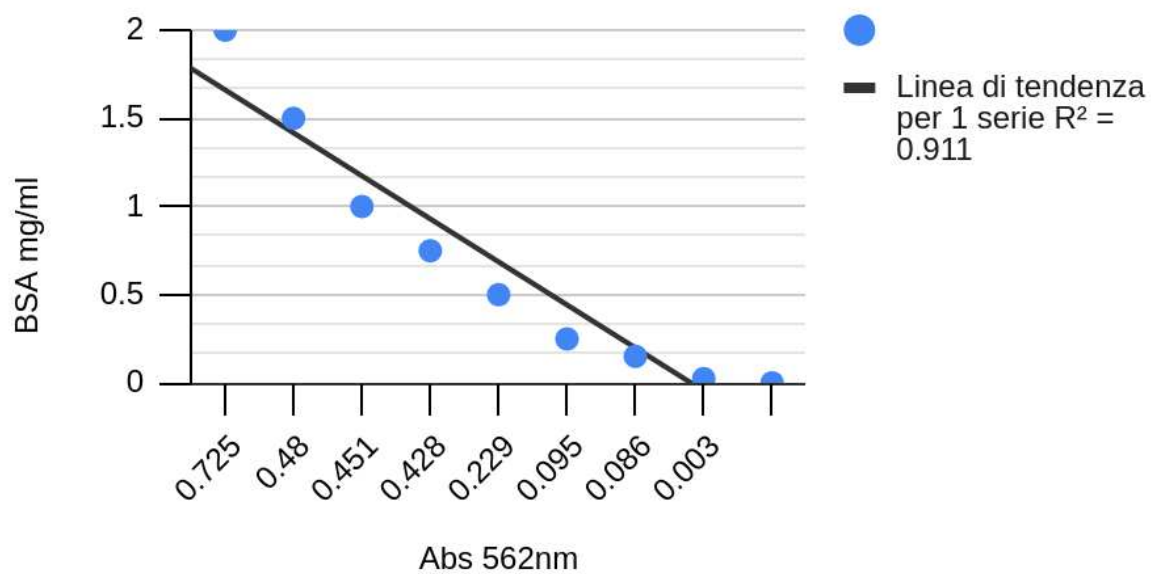


Figura 23. Retta di taratura con BSA.

6. Risultati

6.1 - Sistema di crescita aerobico

Le curve di crescita dei modelli aerobici (Figura 24) erano differenti a seconda che le colture venissero monitorate con l'aggiunta o meno di elementi in traccia. Nello specifico è possibile apprezzare due differenze: la prima è che il plateau massimo di biomassa totale è diverso tra i due sistemi di crescita e la resa cellulare è minore in assenza di metalli; la seconda è che i due modelli cominciano a divergere in piena fase esponenziale (intorno alla 8h). Essendo un sistema aperto l'ossigeno disciolto è in costante scambio con quello atmosferico ed è stato approssimato al 21 % a 37 °C .

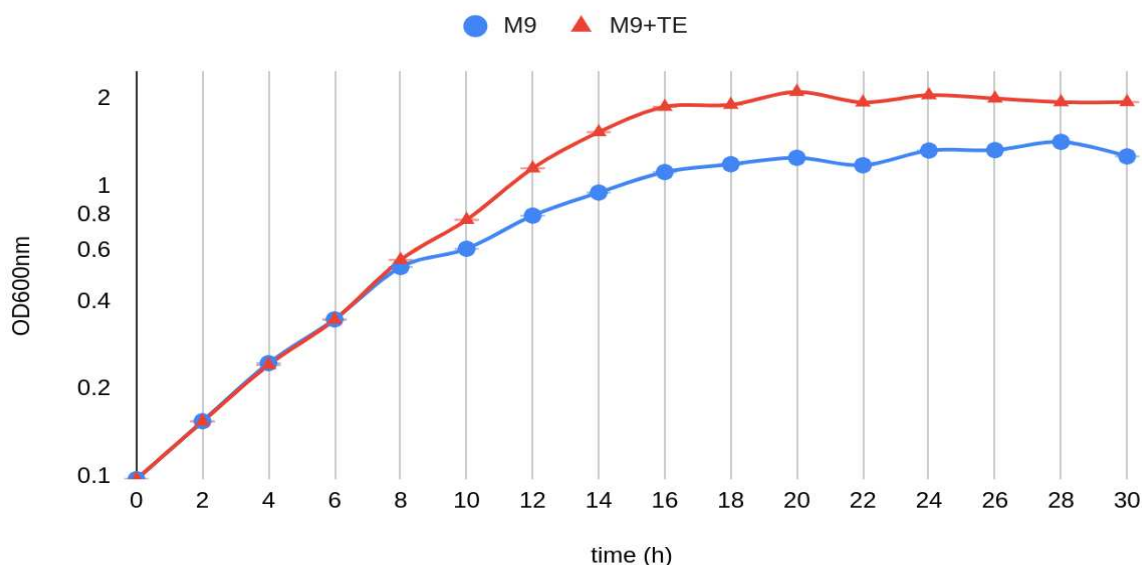


Figura 24. Curve di crescita con sistema aerobico usando il terreno M9 (M9) e M9 con aggiunta di metalli in traccia (M9+TE). La crescita è riportata ogni 2 ore come densità ottica letta a 600 nm e riportata in grafico semilogaritmico. I dati riportati ad ogni time point rappresentano la media di tre repliche biologiche indipendenti. In tutti i casi la variabilità tra le repliche è risultata inferiore all'1 %, e non è stata riportata nei grafici.

6.1.1 - Valutazione dell'influenza del Ferro nei modelli aerobici

Nella Figura 25, è possibile apprezzare la differenza tra la crescita del batterio in M9 con l'aggiunta di uno stock di elementi in traccia e la crescita del batterio in semplice M9. Il tasso di crescita (il coefficiente angolare) nelle fasi esponenziali è diverso tra i modelli con e senza elementi in traccia. Risultano infatti paragonabili le curve ottenute con M9 con elementi in traccia (in rosso) e con elementi in traccia senza Fe (in giallo) con tempi di generazione (g), di 4h. Dalla curva si evince anche, che in presenza di M9 e Fe come unico metallo, lo sviluppo è più lento, seppur comunque superiore alla crescita con M9 base, con tempi di generazione più lunghi (g=5 h in M9+Fe vs. g=10h in M9),

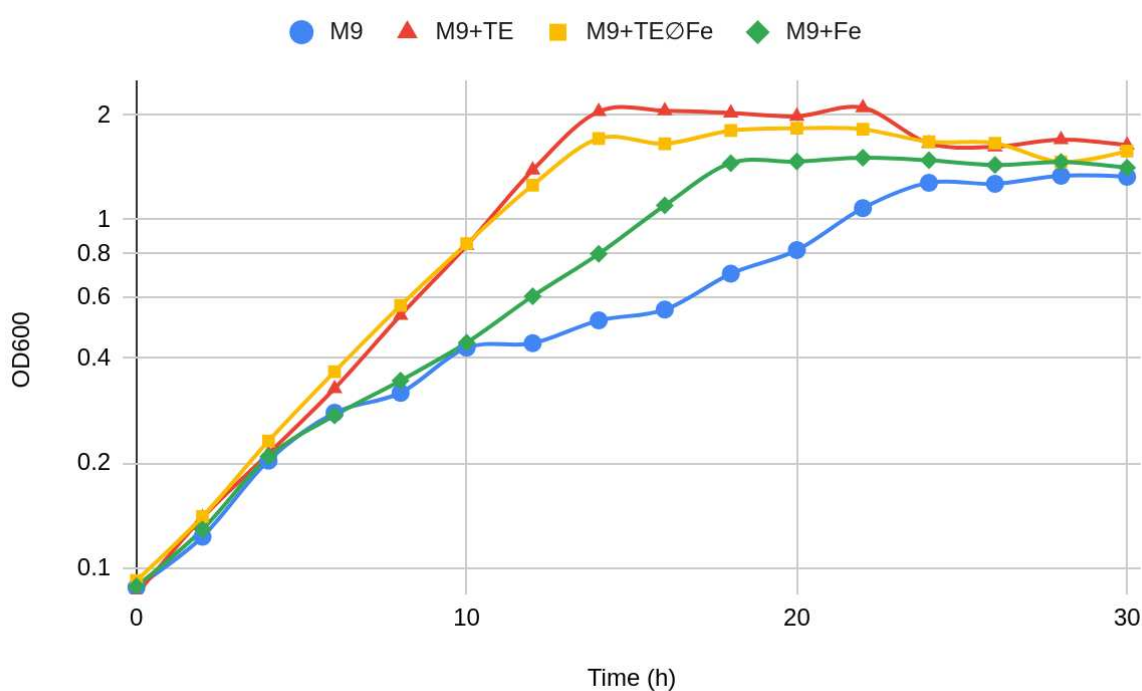


Figura 25. Sistema di crescita in aerobiosi usando il terreno M9 (M9), M9 con elementi in traccia (M9+TE), M9 con elementi in traccia senza Fe (M9+TE∅Fe) e M9 con Fe (M9+Fe). La crescita è riportata ogni 2 ore come densità ottica letta a 600 nm e riportata in grafico semilogaritmico. I dati riportati ad ogni time point rappresentano la media di tre repliche biologiche indipendenti. In tutti i casi la variabilità tra le repliche è risultata inferiore all'1 %, e non è stata riportata nei grafici.

6.1.2 - Valutazione del consumo di glucosio nei modelli aerobici

La fonte principale di carbonio dei sistemi di coltura è il glucosio. Abbiamo quindi analizzato aliquote delle colture del ceppo cresciuto nelle due condizioni (in M9 e in M9+TE) prelevate in tre tempi successivi (T_0 , T_{12} , T_{30}) dopo aver allontanato la componente cellulare, per valutare la quantità di glucosio disciolta. A T_0 entrambe le colture possiedono ancora tutto il glucosio fornito durante la complementazione dei terreni. A T_{12} risulta evidente la differenza di consumo di glucosio tra il modello con gli elementi in traccia e quello senza, infatti a T_{12} in M9 base nella coltura è stato consumato il 68% del glucosio fornito in partenza, mentre in M9+TE il consumo è stato del 50% (in Figura 26 sono riportate in giallo e verde le percentuali di glucosio residuo rispetto alla concentrazione di glucosio iniziale, riportata come 100%). A T_{30} il glucosio risultava esaurito in entrambi i modelli (Figura 26).

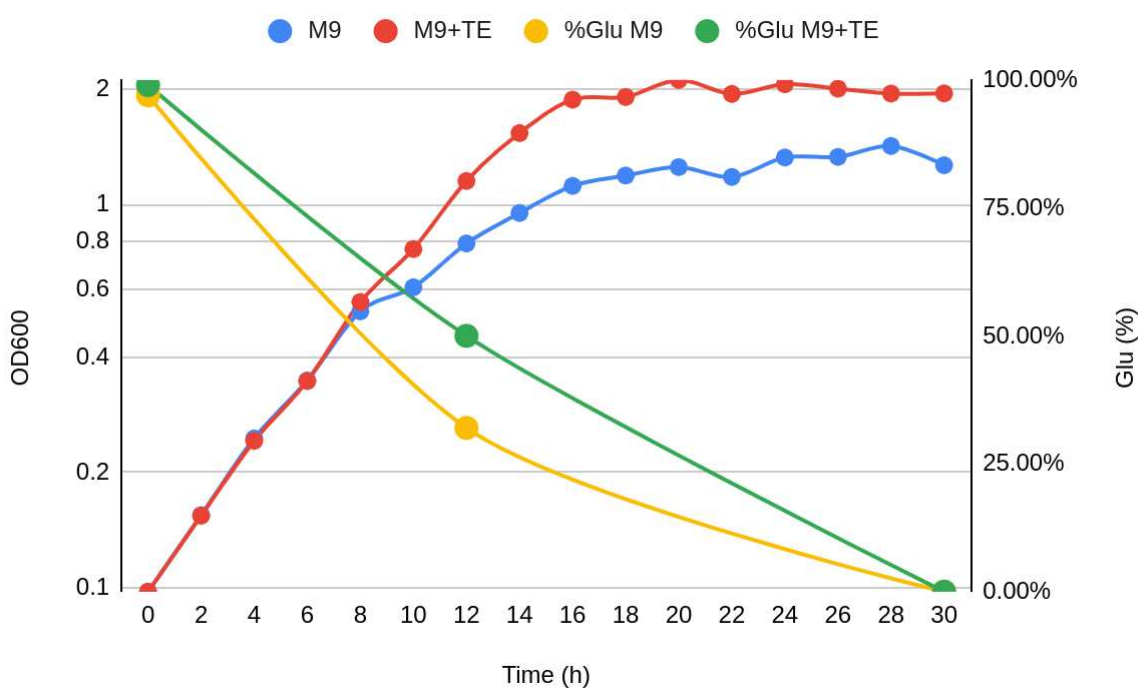


Figura 26. Grafico di valutazione del consumo di Glucosio in relazione alle curve di crescita.

6.2 - Sistema di crescita anaerobico

I sistemi chiusi partono tutti da un livello di ossigeno del 21 % (quello atmosferico). In entrambe le curve il consumo dell'ossigeno e il passaggio alla microaerofilia avvengono in fase esponenziale tra le 6h e le 8h. Anche in questo tipo di esperimenti c'è una buona differenza tra la resa massima raggiunta dalle popolazioni batteriche cresciute con elementi in traccia e quelle cresciute senza. Un particolare da sottolineare in entrambe le curve è la presenza di un punto di flesso nella curva a 8h, dove la velocità di crescita diminuisce leggermente per poi incrementare nuovamente (Figura 27).

Al fine di seguire le fasi di respirazione anaerobica e di fermentazione abbiamo monitorato la concentrazione di ossigeno disciolto, il pH del terreno e la quantità di nitrato ad ogni time point. La differenza tra il sistema base e quello con gli elementi in traccia è netta. In questo caso la produzione di acidi organici e il differenziarsi delle due curve relative alla biomassa, cominciano dopo le prime 4h e raggiungono l'acidificazione massima entrambe a 14h (fase fermentativa)(Figura 28). Assistiamo tuttavia ad una produzione di acidi maggiore nei modelli con elementi in traccia, mentre l'acidificazione in M9 base risulta più graduale.

Per quanto riguarda il nitrato (Figura 29), il consumo è moderato nelle prime 6h in entrambi i modelli, mentre notiamo un massiccio consumo a partire dalle 8h. Anche in questo caso nel modello con gli elementi in traccia osserviamo un consumo più rapido e anticipato di circa 4h rispetto al modello con M9 base.

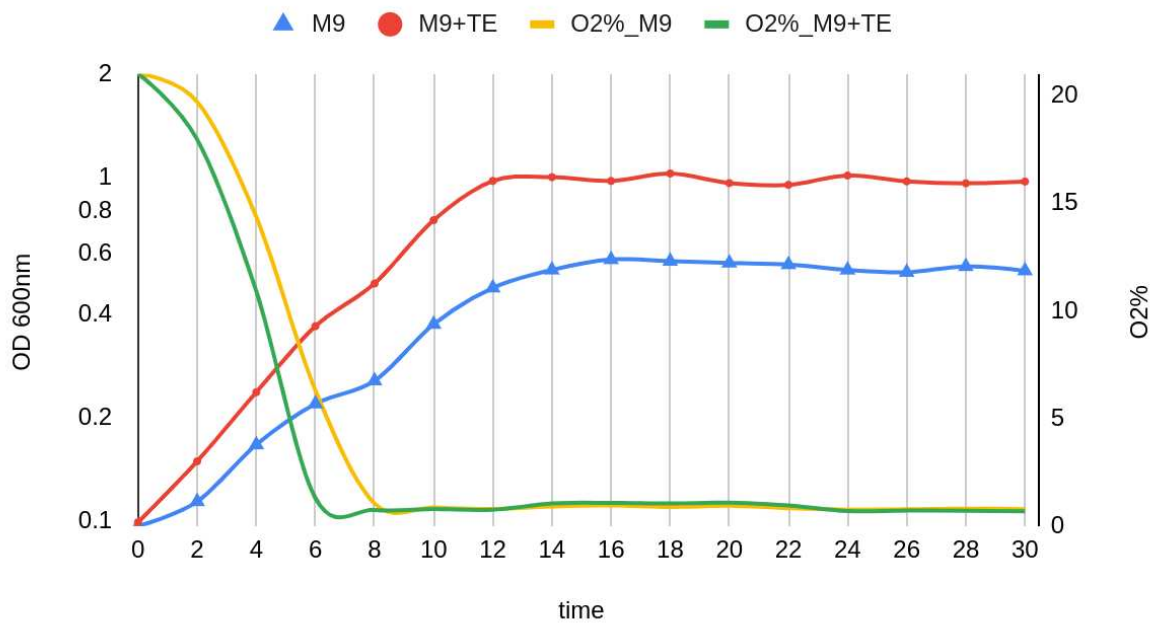


Figura 27. Sistema di crescita Anaerobico usando M9 con (M9+TE) e senza (M9) elementi in traccia incrociati con i dati della % di O₂ in fase. La crescita è riportata ogni 2 ore come densità ottica letta a 600 nm e riportata in grafico semilogaritmico. I dati riportati ad ogni time point rappresentano la media di tre repliche biologiche indipendenti. In tutti i casi la variabilità tra le repliche è risultata inferiore all'1 %, e non è stata riportata nei grafici.

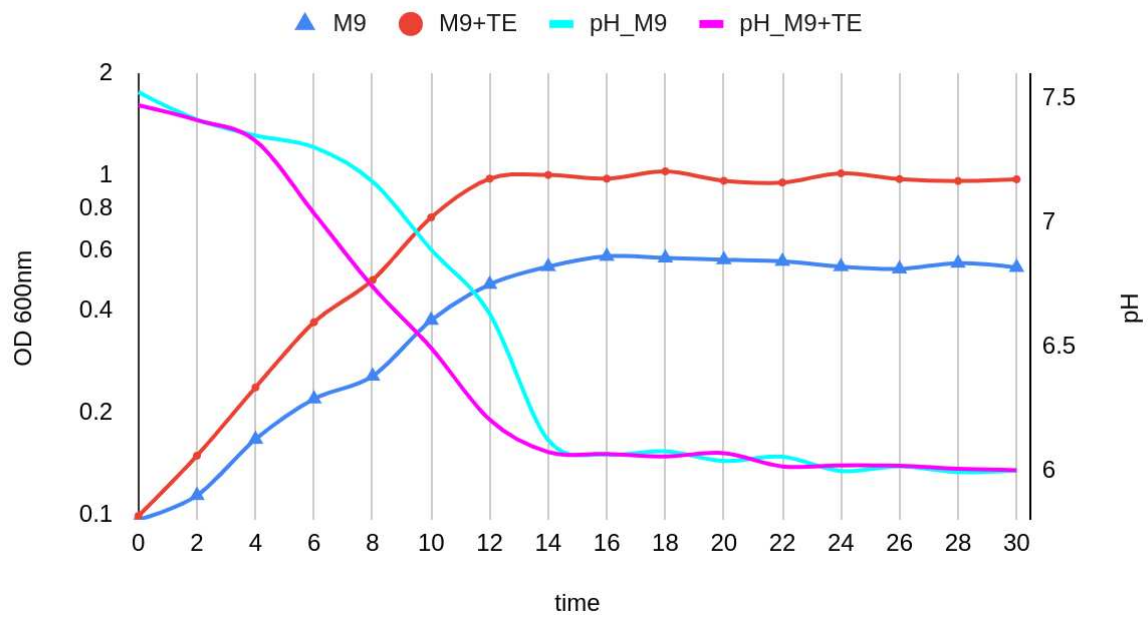


Figura 28. Comparazione tra i valori di acidificazione del terreno e di biomassa nei sistemi anaerobici. La crescita è riportata ogni 2 ore come densità ottica letta a 600 nm e riportata in grafico semilogaritmico.

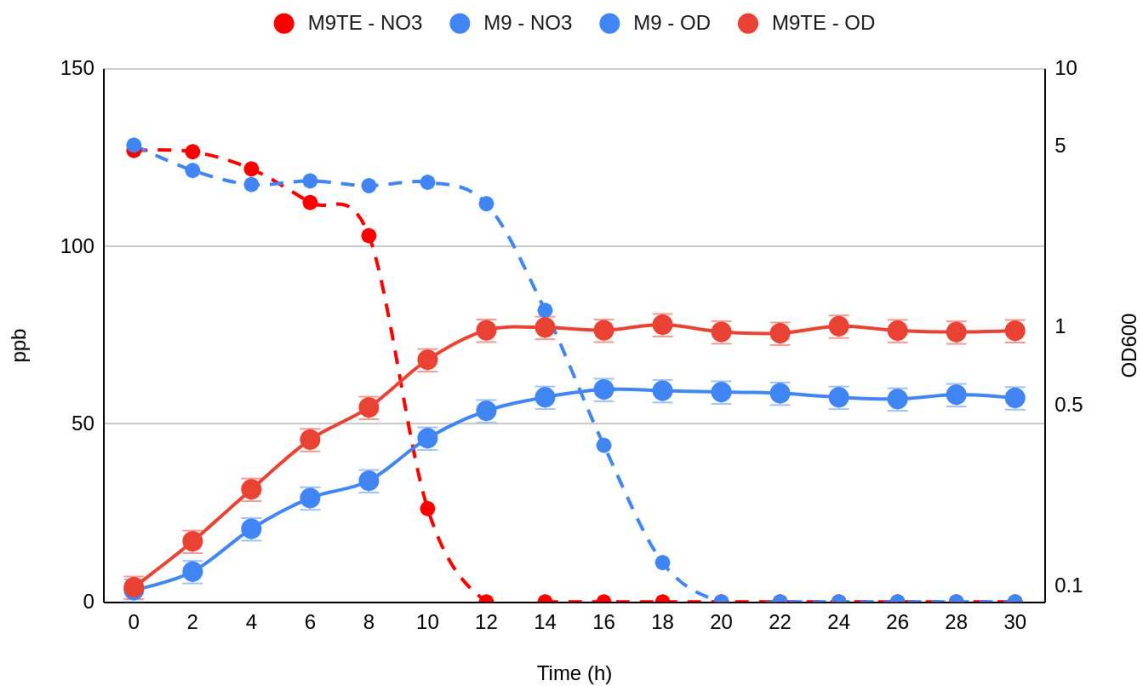


Figura 29 Comparazione tra le curve della biomassa (OD600) e i valori ottenuti sul Nitrato tramite ICP-MS.

6.2.1 Consumo di NH_3^+ e produzione di acidi organici

Abbiamo incrociato i dati ottenuti dalla valutazione del pH con i dati dell'ossigeno per ciascun time point (Figura 30). La riduzione del pH inizia quando l'ossigeno è già molto ridotto (a partire dalle 4h). Tra le 6h e le 8h l'ossigeno si azzerava in entrambe le curve quindi termina la respirazione aerobica e teoricamente inizia la respirazione anaerobica del nitrato. La fermentazione è valutata monitorando il pH e nei modelli con gli elementi in traccia possiamo notare una acidificazione più alta tra le 4h e le 12h. A 14h le colture sono entrambe in completa fermentazione avendo un pH ormai di 1.5 unità di pH più basso rispetto alle condizioni di inizio crescita.

Dall'incrocio dei dati sul consumo di nitrato e quelli di riduzione del pH (Figura 31), possiamo constatare che le quantità di nitrato diminuiscono negli stessi tempi nei quali cominciano ad essere prodotti acidi organici.

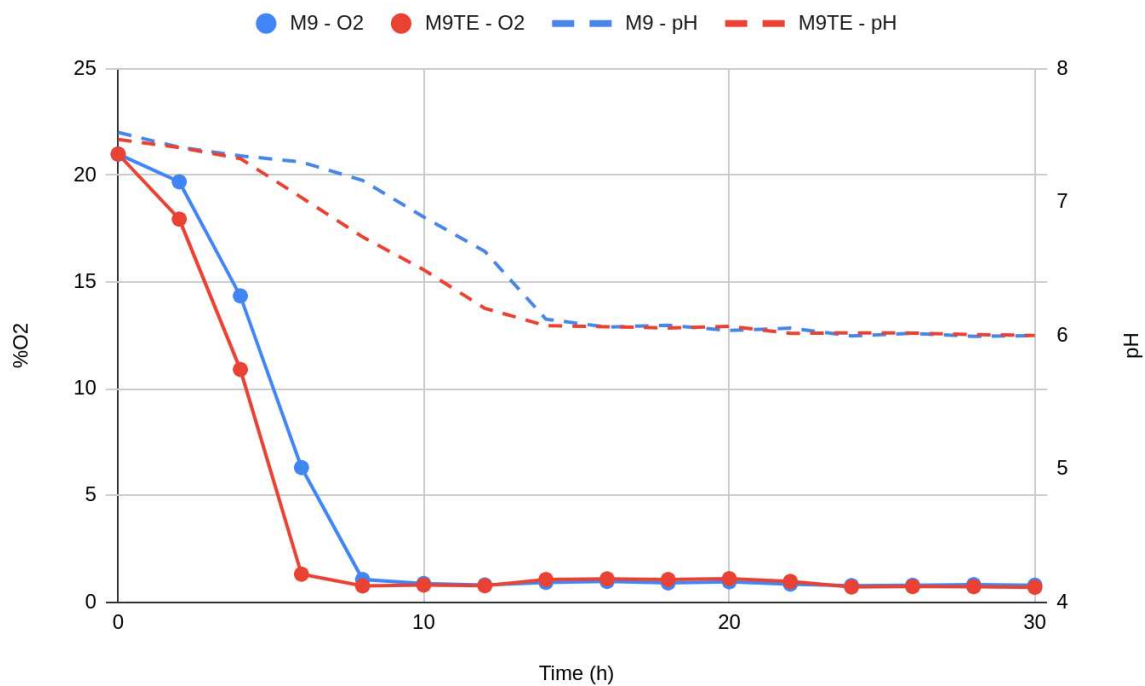


Figura 30. Comparazione tra i valori di acidificazione del terreno e consumo di ossigeno in fase. I dati riportati ad ogni time point rappresentano la media di tre repliche biologiche indipendenti.

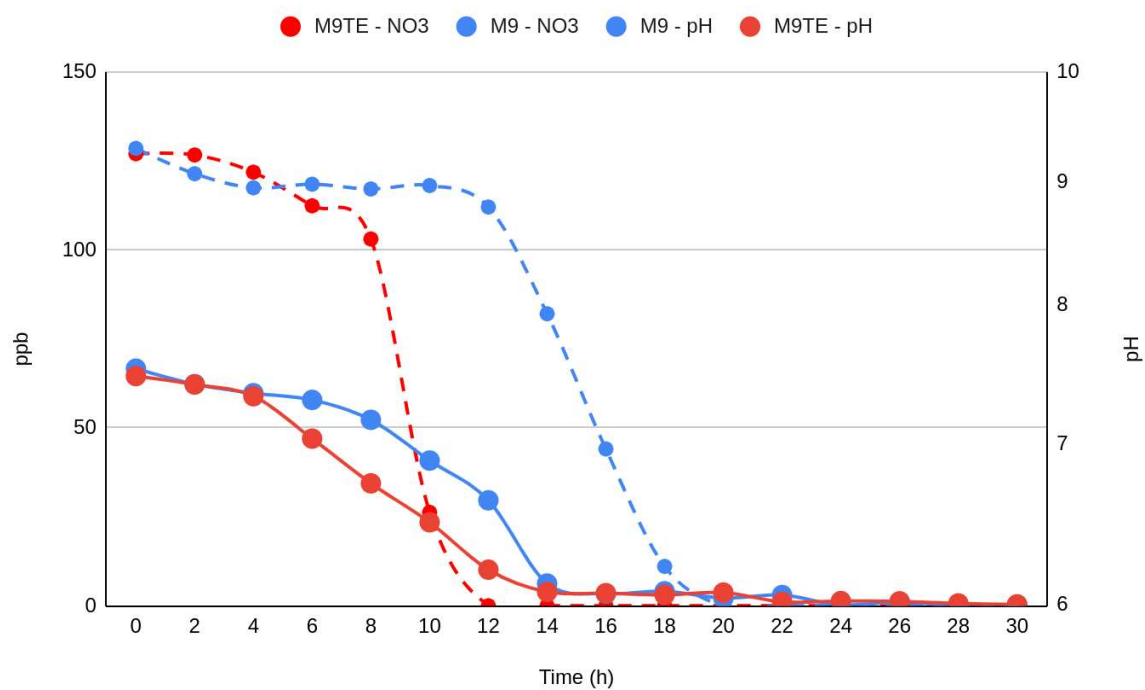


Figura 31 Confronto tra dati di consumo dell' NO_3^- e dati della produzione di acidi organici.

7. Discussione

In letteratura ci sono numerosi studi che analizzano il passaggio da aerobiosi ad anaerobiosi in *E.coli* K12, analizzando i cambiamenti trascrizionali necessari per passare alla fase anaerobica (Tseng et al., 1996) (Trotter et al., 2011). Nonostante questo, nessuno studio descrive la crescita su due accettori di elettroni come “diauxica”, e tanto meno ha investigato il ruolo degli elementi in tracce nel mediare il passaggio ad accettori di elettroni diversi.

In questo studio abbiamo per la prima volta descritto la crescita di *E.coli* K12 su due accettori di elettroni (ossigeno e nitrati) come una crescita diauxica. Il termine, applicato originariamente da Monod per la crescita in presenza di due fronti di carbonio distinte, si riferisce al tipico andamento della curva di crescita della popolazione in coltura. Nei nostri esperimenti abbiamo dimostrato questa stessa caratteristica curva di crescita anche in presenza di due accettori di elettroni alternativi (Figura 27). Il termine diauxia, anche se non è mai stato applicato alla crescita con accettori di elettroni alternativi, risulta appropriato in quanto l’origine del termine si riferisce ad una “doppia fase di crescita esponenziale” della popolazione batterica, senza fare riferimento se questa è riferita alla fonte di carbonio o ad altri processi metabolici. Riteniamo pertanto che il termine diauxia possa e debba anche essere applicato alla crescita con accettori di elettroni alternativi.

Abbiamo inoltre dimostrato che la presenza di elementi in traccia introdotti nel terreno facilita e velocizza le attività metaboliche e di sintesi di *E.coli* K12, che infatti raggiunge biomasse più alte e in minor tempo in presenza della soluzione di elementi in traccia SL-10. Quando questi elementi sono limitanti, l’organismo è costretto ad attivare interi pathway per la sintesi di chelanti, trasportatori e strutture per l’internalizzazione di ciascuno di quegli elementi, abbassando il tasso di duplicazione. Questo fenomeno lo possiamo dedurre anche incrociando i dati della biomassa relativa con quelli del glucosio utilizzato a diversi punti

della curva, osservando infatti un consumo di glucosio maggiore nelle colture con solo M9 (Figura 25). Il fatto che le due curve divergano dopo 8h e che raggiungano due tetti di crescita massima differenti, ci fornisce un'ulteriore conferma. Si presume che la maggior crescita osservata nel sistema con gli elementi in traccia, sia dovuta proprio al fatto che nella coltura priva di questi elementi, gli organismi investono energia non solo nella neosintesi delle strutture cellulari ma anche nell'espressione di quei pathway per la ricerca e l'assimilazione di quelle molecole. Nelle colture alle quali erano stati forniti gli elementi in traccia, possiamo ipotizzare che questo non succeda e che quindi, potendo investire più energia nelle vie metaboliche non limitate da elemento alcuno riescano a mantenere costante il tasso di duplicazione, mantenendo una crescita lineare.

Abbiamo ipotizzato che il maggior costo metabolico in assenza di elementi in traccia fosse ascrivibile principalmente all'assenza di ferro visto il suo ruolo centrale in numerose proteine, inclusi i citocromi e l'eme nitrito reductasi (Figure 14 e 16). I test effettuati in presenza e assenza di Fe (Figura 25) sono serviti ad identificare l'effetto di questo metallo rispetto a quello riscontrato nella crescita aerobica in presenza e assenza di elementi in traccia. Quello che avevamo inizialmente ipotizzato, è stato confermato dalle curve di crescita (Figura 25). Anche in questo caso i modelli cominciano a divergere tra le 6h e le 8h, in piena fase di crescita esponenziale.

Vanno fatte a questo punto, delle considerazioni riguardo l'uptake del Fe nelle cellule. Sappiamo infatti che piccole concentrazioni metalliche sono comunque sempre presenti nei terreni e nella vetreria, ma quando le cellule aumentano di numero in modo esponenziale (superato il primo ciclo di replicazione), questi elementi vengono internalizzati e a quel punto i modelli nei quali erano state fornite ulteriori concentrazioni di elementi in traccia (M9 con elementi in traccia e M9 con elementi in traccia senza Fe), continuavano a crescere, mentre

nei modelli nei quali non erano presenti concentrazioni addizionali la crescita risultava limitata (M9 base e M9 con il solo Fe), sebbene ci fosse una netta differenza tra il modello con solo Fe e quello con M9 base.

Nei sistemi chiusi le considerazioni non sono unicamente basate sulle concentrazioni degli elementi in traccia ma anche sull'attivazione di pathway di respirazione differenti con ossidasi terminali diverse e sull'attivazione dei pathway fermentativi. Se valutiamo gli eventi in ordine cronologico durante le fasi esponenziali (Figure 26 e 27), i parametri che abbiamo valutato (pH, NO_3^+ , O_2) indicano che nell'arco di qualche ora (tra le 6h e le 8h) si accavallano più eventi. L'ossigeno scende tra il 7 % e il 5 %, inducendo la coltura batterica ad entrare di fatto in microaerofilia. Sappiamo quindi che sicuramente i batteri iniziano ad usare un citocromo ad alta affinità per l' O_2 (cyt-bd) e che probabilmente molte cellule cominciano ad esprimere le nitrato reduttasi (Nar). Nonostante sia ancora presente ossigeno vengono prodotti acidi organici (il pH in quelle ore è tra 7.3 e 7.1 per il modello con solo M9 e tra 7 e 6.7 per il modello con gli elementi in traccia). In realtà il metabolismo respiratorio e quello fermentativo sono vincolati l'uno all'altro e quindi è possibile che nella coltura già alcuni batteri fermentino il glucosio data la scarsa abbondanza di ossigeno e nitrato. Focalizzandoci sulla singola curva relativa alla biomassa (OD_{600}) l'abbiamo descritta come "diauxica"; la doppia crescita in questo caso la visualizziamo proprio in quel gap temporale tra le 6h e le 8h. Essendo l' O_2 la variabile che in questa fase comincia a limitare la crescita batterica, possiamo ipotizzare che il rallentamento nelle duplicazioni cellulari sia dovuto proprio ai cambiamenti di pathway che il batterio deve fare per adattarsi alla nuova condizione (deve trascrivere, tradurre e sintetizzare tutte le proteine per la respirazione del nitrato e per i pathway fermentativi), e una volta prodotte queste molecole, in assenza di ulteriori fattori limitanti, potrà riprendere a moltiplicarsi in modo esponenziale. Trattandosi di vie fondamentali per la vita del batterio possiamo considerare come indispensabili le ossidoreduttasi terminali delle

catene respiratorie, quindi tra le proteine prodotte ci saranno sicuramente i citocromi, le nitrato reductasi e gli enzimi fermentativi. Ulteriori verifiche saranno effettuate testando:

- Lo sviluppo della coltura con NO_3^- non limitante (nei test svolti il nitrato era in concentrazioni 2 mM);
- la risposta del batterio utilizzando il terreno M9 con elementi in traccia e Molibdeno (elemento chiave per le NarGHI) valutando se questo accentua il fenomeno diauxico della curva di crescita;
- la risposta del batterio utilizzando il terreno M9 con elementi in traccia ma privo di Rame (cofattore metallico del citocromo *bo*), provando ad indurre una riduzione dell'espressione dei pathway aerobici in favore di quelli anaerobici.

Ognuno di questi test dovrà essere supportato da analisi proteomica andando a valutare l'espressione di chelanti e trasportatori di ognuno degli elementi d'interesse.

8. Conclusioni

Questo studio modello delinea in modo sempre più evidente il nesso tra le componenti metalliche e i batteri. Con i dati raccolti sulla fisiologia di *E.coli* K12 è possibile progettare nuovi test usando gli stessi metodi per valutare l'impatto che hanno altri elementi metallici sulla crescita microbica. A questi test dovranno essere integrati dati di conferma inerenti la proteomica e la trascrittomica dopo l'adattamento delle cellule al terreno. Correlare il tasso di espressione di una proteina, la costante di affinità K_m per il suo substrato, con la disponibilità intra- ed extracellulare di un cofattore specifico della proteina stessa, rappresenterebbe uno strumento innovativo, con applicazioni multidisciplinari (filogenesi enzimatica, mutagenesi, proteomica comparativa, geochimica, ecc).

Va precisato che non sono stati trovati precedenti in bibliografia, per l'uso dell'aggettivo "diauxica" in riferimento ad una curva di crescita bifasica in relazione agli accettori e ai donatori di elettroni delle catene respiratorie. Questo di per sé è un nuovo potenziale approccio per studiare la fisiologia, il metabolismo e la cinetica enzimatica nei procarioti.

9. Bibliografia

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y.-S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., et al. (1999). Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and *fur* Mutants are Iron Deficient. *J. Bacteriol.* 181, 1415–1428. doi: 10.1128/JB.181.5.1415-1428.1999.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X.
- B. BORISOV, V. (2011). Oxygen as Acceptor.pdf.
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., and Bardwell, J. C. A. (1999). Oxidative Protein Folding Is Driven by the Electron Transport System. *Cell* 98, 217–227. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81016-8.
- Bekker, M., De Vries, S., Ter Beek, A., Hellingwerf, K. J., and De Mattos, M. J. T. (2009). Respiration of *Escherichia coli* Can Be Fully Uncoupled via the Nonelectrogenic Terminal Cytochrome *bd* -II Oxidase. *J. Bacteriol.* 191, 5510–5517. doi: 10.1128/JB.00562-09.
- Bertrand, P., Frangioni, B., Dementin, S., Sabaty, M., Arnoux, P., Guigliarelli, B., et al. (2007). Effects of Slow Substrate Binding and Release in Redox Enzymes: Theory and Application to Periplasmic Nitrate Reductase. *J. Phys. Chem. B* 111, 10300–10311. doi: 10.1021/jp074340j.
- Blaiseau, P. L., and Holmes, A. M. (2021). Diauxic Inhibition: Jacques Monod's Ignored Work. *J. Hist. Biol.* 54, 175–196. doi: 10.1007/s10739-021-09639-4.
- Blankenship, R. E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33, 91–111. doi: 10.1007/BF00039173.
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807, 1398–1413. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.06.016.
- Calhoun, M. W., and Newton, G. (n.d.). Physical Map Locations of Genes Encoding Components of the Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli*.
- Ceccaldi, P., Rendon, J., Léger, C., Toci, R., Guigliarelli, B., Magalon, A., et al. (2015). Reductive activation of *E. coli* respiratory nitrate reductase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1847, 1055–1063. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.06.007.
- Clark, D. P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 223–234. doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03398.x.
- Correggia, M., Iorio, L. di, Bastianoni, A. B., Yucel, M., Cordone, A., and Giovannelli, D. (2023). Standard Operating Procedure for the analysis of major ions in hydrothermal fluids by Ion Chromatography. doi: 10.31219/osf.io/jqnx3.
- Cotter, P. A., Melville, S. B., Albrecht, J. A., and Gunsalus, R. P. (1997). Aerobic regulation of cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli* : roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol. Microbiol.* 25, 605–615. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5031860.x.
- Dupont, C. L., Butcher, A., Valas, R. E., Bourne, P. E., and Caetano-Anollés, G. (2010). History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10567–10572. doi: 10.1073/pnas.0912491107.
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., and Delong, E. F. (2008). The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science* 320, 1034–1039. doi:

- 10.1126/science.1153213.
- García-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994). The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176, 5587–5600. doi: 10.1128/jb.176.18.5587-5600.1994.
- González, P. J., Correia, C., Moura, I., Brondino, C. D., and Moura, J. J. G. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* 100, 1015–1023. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024.
- Govantes, F., Albrecht, J. A., and Gunsalus, R. P. (2000). Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites. *Mol. Microbiol.* 37, 1456–1469. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02100.x.
- Hay Mele, B., Monticelli, M., Leone, S., Bastoni, D., Barosa, B., Cascone, M., et al. (2023). Oxidoreductases and metal cofactors in the functioning of Earth. *Biochemistry, Biophysics, and Structural Biology* doi: 10.31223/X58H36.
- Jelen, B. I., Giovannelli, D., and Falkowski, P. G. (2016). The Role of Microbial Electron Transfer in the Coevolution of the Biosphere and Geosphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 45–62. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095521.
- Johnson, M. K. (1996). Tungstoenzymes.
- Locatelli, F. M., Goo, K.-S., and Ulanova, D. (2016). Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes. *Metallomics* 8, 469–480. doi: 10.1039/C5MT00324E.
- Mendel, R. R. (2005). Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Trans.*, 3404. doi: 10.1039/b505527j.
- Metcalf, G. D., Smith, T. W., and Hippler, M. (2020). On-line analysis and in situ pH monitoring of mixed acid fermentation by *Escherichia coli* using combined FTIR and Raman techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 7307–7319. doi: 10.1007/s00216-020-02865-5.
- Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1983). The purification and characterization of the cytochrome d terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 258, 9159–9165. doi: 10.1016/S0021-9258(17)44645-X.
- Miller, M. J., Hermodson, M., and Gennis, R. B. (1988). The active form of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli* is a heterodimer containing one copy of each of the two subunits. *J. Biol. Chem.* 263, 5235–5240. doi: 10.1016/S0021-9258(18)60705-7.
- Moore, E. K., Jelen, B. I., Giovannelli, D., Raanan, H., and Falkowski, P. G. (2017). Metal availability and the expanding network of microbial metabolisms in the Archaean eon. *Nat. Geosci.* 10, 629–636. doi: 10.1038/ngeo3006.
- Rensing, C., and Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 197–213. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00049-4.
- Rothery, R. A., Workun, G. J., and Weiner, J. H. (2008). The prokaryotic complex iron–sulfur molybdoenzyme family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1897–1929. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.09.002.
- Rudd, K. E. (2000). EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28, 60–64. doi: 10.1093/nar/28.1.60.
- Shafiee, R. T., Diver, P. J., Snow, J. T., Zhang, Q., and Rickaby, R. E. M. (2021). Marine ammonia-oxidising archaea and bacteria occupy distinct iron and copper niches. *ISME Commun.* 1, 1. doi: 10.1038/s43705-021-00001-7.
- Smrzka, D., Zwicker, J., Bach, W., Feng, D., Himmler, T., Chen, D., et al. (2019). The behavior of trace elements in seawater, sedimentary pore water, and their

- incorporation into carbonate minerals: a review. *Facies* 65, 41. doi: 10.1007/s10347-019-0581-4.
- Sousa, E. H. S., Carepo, M. S. P., and Moura, J. J. G. (2020). Nitrate-nitrite fate and oxygen sensing in dormant *Mycobacterium tuberculosis*: A bioinorganic approach highlighting the importance of transition metals. *Coord. Chem. Rev.* 423, 213476. doi: 10.1016/j.ccr.2020.213476.
- Srivastava, S., Dong, H., Baars, O., and Sheng, Y. (2023). Bioavailability of mineral-associated trace metals as cofactors for nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii*. *Geobiology* 21, 507–519. doi: 10.1111/gbi.12552.
- Trotter, E. W., Rolfe, M. D., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Williamson, M. P., Sanguinetti, G., et al. (2011). Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 Metabolism during the Initial Phase of Transition from an Anaerobic to a Micro-Aerobic Environment. *PLoS ONE* 6, e25501. doi: 10.1371/journal.pone.0025501.
- Tseng, C. P., Albrecht, J., and Gunsalus, R. P. (1996). Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 1094–1098. doi: 10.1128/jb.178.4.1094-1098.1996.
- Unden, G., and Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1320, 217–234. doi: 10.1016/S0005-2728(97)00034-0.
- Vernadsky, V. I. (2012). *The biosphere*. Springer Science & Business Media.
- Wang, H., Tseng, C.-P., and Gunsalus, R. P. (1999). The *napF* and *narG* Nitrate Reductase Operons in *Escherichia coli* Are Differentially Expressed in Response to Submicromolar Concentrations of Nitrate but Not Nitrite. *J. Bacteriol.* 181, 5303–5308. doi: 10.1128/JB.181.17.5303-5308.1999.
- Zerkle, A. L., House, C. H., and Brantley, S. L. (2005). Biogeochemical signatures through time as inferred from whole microbial genomes. *Am. J. Sci.* 305, 467–502.