



Benzoik Asidin *Vitreoscilla* Hemogloblin Geni Aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa* Tarafından Yıkımı

Hüseyin KAHRAMAN, Hikmet GECKİL
İnönü Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, MALATYA
e-mail: hkahraman@inonu.edu.tr, hgeckil@inonu.edu.tr

Özet

Bu çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* ile onun *Vitreoscilla* hemogloblin geni klonlanmış rekombinant suşunun önemli endüstriyel aromatik kirleticilerden birisi olan benzoik asit yıkım yetenekleri araştırılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* ve çeşitli suşları gen transferi ve ekspresyonu gibi çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin, çoğu canlılar için zararlı olan birçok heterohalkasal aromatik bileşikler doğal olarak yıkma potansiyeline sahip olmaları, onlara olan ilgiyi arttırmıştır. Bu çalışmada *Vitreoscilla* sp.'den elde edilen bakteriyel hemogloblin (VHb) geni (*vgb*) klonlanmış rekombinant bir suş (PaJC) kullanılarak, iyi bir oksijen alım sistemi olan VHb'nin bu rekombinantın benzoik asiti yıkma potansiyeline etkisi yabancı tip konakçı bakteri ile karşılaştırılmalı biçimde çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Benzoik asit, Bakteriyel hemogloblin, *Vitreoscilla* hemogloblini, *Pseudomonas aeruginosa*

Degradation of Benzoic Acid by *Pseudomonas aeruginosa* engineered with *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene

Abstract

This study is concerned with the potential use of *Pseudomonas aeruginosa* and its recombinant strain carrying *Vitreoscilla* hemoglobin gene for degradation of an important harmful aromatic compound, the benzoic acid. *Pseudomonas aeruginosa* and its various strains are widely known for their ease of use characteristics allowing gene transfer and expression. Moreover, a great deal of interest was paid when it was discovered that these bacteria could be utilized for the degradation of many heterocyclic aromatic compounds. In this study, a recombinant strain (PaJC) of *P. aeruginosa* cloned with bacterial hemoglobin (VHb) gene (*vgb*) from *Vitreoscilla* sp. was studied in comparison to the wild-type host strain for its benzoic acid degradation potential.

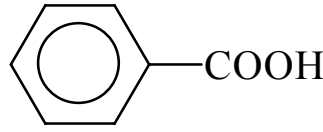
Key words: Benzoic acid, Bacterial hemoglobin, *Vitreoscilla* hemoglobin, *Pseudomonas aeruginosa*

1. Giriş

Çağdaş yaşamın bir sonucu olarak ortaya çıkan kirlilik, günümüzde üzerinde en çok durulan ancak, en az çözüm getirilebilen konularından biridir. Bu çeşit kirlilikten bir tanesi de petrol ve onun rafine ürünleri içinde önemli oranlarda bulunan benzen ve onun alkillenmiş türevleri olan tipik aromatik halkalı bileşiklerdir. Esasen, tüm aromatik hidrokarbonlar birer benzen türevidir. Bu bileşikler her ne kadar yapı olarak halkasal alkanlara benzerlik gösterebilirler de, daha kararlıdır ve alkanların uğradıkları reaksiyonlara uğramazlar. Bu nedenle, daha tehlikeli çevresel kirleticiler olarak görülmektedirler. Canlılar tarafından yapılmayan bu maddeler dolayısıyla ile hemen bütün canlılar için toksik özellik taşırlar. Bu maddeler ile kirlenmiş

çevrelere uygulanan fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon metotları tam ve etkili bir çözüm getirmekten uzaktır. Dolayısı ile son yıllarda bu tür işlemler için biyokimyasal metotların potansiyel kullanılabilirliği araştırılmış ve özellikle bu maddeleri daha zararsız bileşiklere yıkmak için gerekli olan gen sistemleri ile donatılmış *Pseudomonas* bakteri türlerinin alternatif kullanım alanı bulabileceği saptanmıştır.

Benzoik asit, gıdalarda mikrobik bozulmayı önlemek için kullanılır. En çok kullanıldığı alanlar, meyve suyu, marmelat, reçel, gazlı içecekler, turşular, ketçap ve benzeri ürünlerdir. Benzoik asit, genellikle sodyum tuzu olarak (sodyum benzoat) kullanılır. İlave edildiği gıdanın tadını etkiler. Benzoik asitin kimyasal yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Benzoik asitin kimyasal yapısı

Pseudomonas türleri büyük çeşitlilik gösteren toksik kimyasalların biyolojik yıkımını gerçekleştirebilmektedirler [1- 3]. Aerobik ve kemoorganotrof olan *Pseudomonas* türlerinin bazıları da fakültatif kemolitotrof olup heterosiklik ve aromatik maddeleri yıkma veya hücrenel enerji ve materyal olarak kullanma kabiliyetindedirler [4, 5]. Aerobik şartlar altında, aromatik hidrokarbonlar, bakteri oksijenazları tarafından okside edilebilirler. Bu enzimler, aromatik halkanın içine moleküler oksijenin girmesini NAD(P)H bağlı olarak katalizlerler [6].

Vitreoscilla gram-negatif zorunlu aerobik bir bakteri olup oksijence fakir çevrelerde büyüme eğilimine sahiptir. İlk bakteriyel hemoglobin, oksijence fakir çevrelerde bulunan *Vitreoscilla* grubu bakterilerden izole edilmiştir ve *Vitreoscilla* hemoglobini (VHb) olarak adlandırılmıştır [7- 10]. Bu genin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan bir çok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir. Özellikle, bakteri ve funguslarda VHb'nin solunumu ve büyümeyi de artırma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren bütün biyoproseslerde (biyoremediasyon'dan rekombinant protein üretimine kadar) uygulama alanı bulabilecektir [1, 11, 12]. “VHb teknolojisi”nin kullanılması ile, toksik aromatik bileşiklerin mikrobiyal oksidatif yıkımlarının arttığı rapor edilmiştir [13].

Yapılan bazı çalışmalarda VHb'nin *Pseudomonas*'larda biyoremediasyonu arttırmada önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [11, 14]. Bunun en önemli nedenlerinden birisi de yabancı türlere oranla VHb aktarılan türlerin daha yüksek oksijen alınımına sebep olmasıdır [1, 8]. Çünkü, bu tür bir biyoproseste oksijen çoğu zaman sınırlayıcı rol oynamaktadır.

Benzoik asit gibi aromatik maddeler ile kirlenmiş doğal çevrelerde, oksijenlenmenin yetersizliği nedeniyle bu aromatik bileşenlerin mikrobiyal yıkımı oldukça güç olmaktadır. Aerobik koşulların, aromatik halkaların parçalanmasını kolaylaştırdığı ve yıkımı daha

hızlandırdığı bilinmektedir. Bu çalışmanın kapsamında, kromozomuna transpozon dayalı bir rekombinasyon sistemi ile *vgb* geni aktarılmış [13] *Pseudomonas aeruginosa* ile gen aktarılmamış yabani tipin benzoik asitin yıkım kapasiteleri karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır. Bu çeşit aromatik bileşiklerin yıkımlarının, aktiviteleri oksijen gerektiren çeşitli oksijenaz ve deoksijenazlarla katalizlenen ve etkin bir oksijen alım ve kullanımını sağlayan sistemle (VHb) daha etkin olacağı düşünülmüştür.

2. Materyal ve Metod

2.1. Çalışmada kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ve *vgb* rekombinantı

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (NRRL B- 771) ve bu bakterinin kromozomuna homolog rekombinasyon ile tek kopya halinde *vgb* entegre edilmiş rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* (PaJC) kullanılmıştır [13].

2.2. Çalışmada kullanılan kültür ortamı

Minimal ortam (MM)'in hazırlanışında, 1litre için; 3 g Na₂HPO₄, 0.003 g CaCl₂, 3 g KH₂PO₄, 0.4 g MgSO₄, 0.5 g NaCl, 2.5 g (NH)₂SO₄ ve iz elementler; 0.025 g ZnSO₄, 0.025 g CuSO₄, 0.025 g MnSO₄, 0.025 g FeSO₄ kullanılmıştır [15- 17].

Besiyeri olarak kullanılan tüm kimyasallar otoklav edildikten sonra kullanılmıştır. Daha sonra besi ortamları pH 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Minimal ortamlarda karbon kaynağı bulunmamaktadır. Bu çalışmada besi ortamı, bakteriler tarafından ortama eklenen benzoik asitin karbon kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığının tespit edilmesi amacı ile kullanılmıştır .

2.3. Minimal kültür koşulları

Öze ile tek koloni alınan hücreler ön adaptasyon için 1.64 mM benzoik asit içeren 10 ml'lik MM besi ortamı içeren tüplere konulmuştur. Tüpler, havalandırmalı çalışma koşulları için 200 rpm ve az havalandırmalı çalışma koşulları için 50 rpm olacak şekilde 37 °C' de çalkalamalı su banyosuna konulmuşlardır [18]. Yaklaşık 17 saat sonra tüplerden havalandırmalı çalışma koşulları için alınan 200 µl gece kültürü 20 ml MM'a konulmuş ve 50 rpm'lik az havalandırmalı çalışma koşulları için 1000 µl gece kültürü, içerisinde 100 ml MM bulunan 125 ml'lik erlenlere ekim yapılmıştır. Daha sonra kültür başlangıç (To) ekimleri yapıldıktan sonra erlenlere 16 mM benzoik asit eklenilmiştir. Buradan alınan örnekler, 10 ml steril % 0.85 NaCl bulunan tüplere konularak bakteri kültürlerinin değişik sulandırmaları elde edilmiştir. 2 saat ara ile ilk 10 saatte alınan kültürler LB plaklarına ekilmiş ve çalışmanın devamında 24 saat ara ile alınan kültürler, 10 ml steril % 0.85 NaCl bulunan tüplere konularak bakteri kültürlerinin değişik sulandırmaları elde edilmiştir. Daha sonra LB plaklarına ekim yapılmıştır. Plaklar 37 °C etüvde 24 saat bekletilmiş ve inkübasyon sonucu oluşan bakteri kolonileri sayılarak bakterilerin logaritmik üreme eğrileri oluşturulmuştur.

2.4. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen tüm veriler en az üç tekrarlı bağımsız deneylerin sonucu olup, her iki bakteri suşu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı ilgili veri noktası için % 95 güvenilirlik seviyesinde *t*-testi yapılarak saptanmıştır.

3. Bulgular

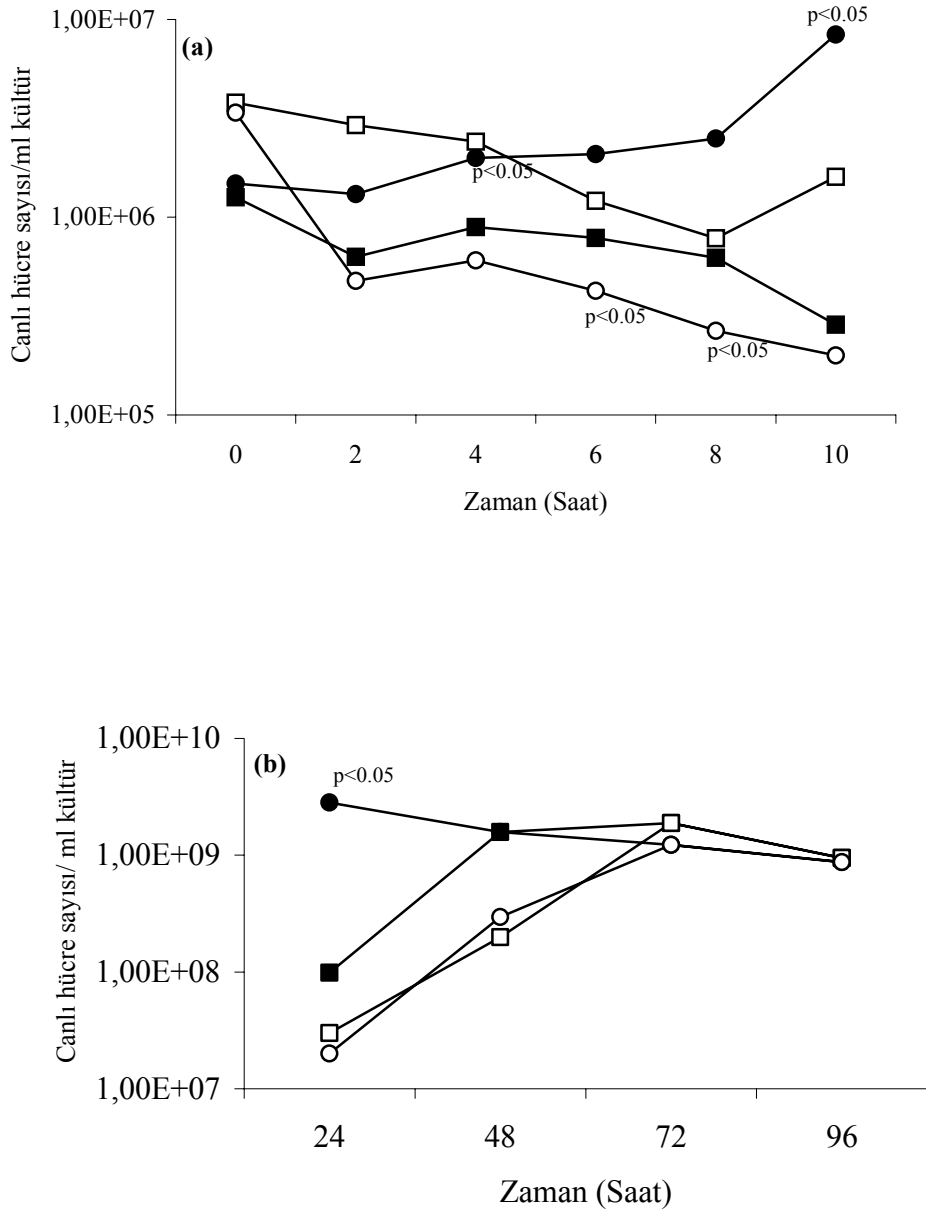
P. aeruginosa ve PaJC rekombinant bakterilerinin logaritmik ve durağan faz hücrelerinin 16 mM benzoik asit ve 200 rpm çalkalamalı ortamda çoğalma karakteristikleri Şekil 2 a ve b'de verilmiştir. Her iki şekil incelendiği zaman PaJC'nin, özellikle ilk 48 saatlik ölçüm aralığında *P. aeruginosa*'dan yüksek bir büyüme karakteristiği gösterdiği gözlenmektedir. Ancak, sadece 4., 10. ve 24. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.05$).

P. aeruginosa ve PaJC rekombinant bakterilerinin logaritmik ve durağan faz hücrelerinin 16 mM benzoik asit ve 50 rpm çalkalamalı ortamda çoğalma karakteristikleri zamana bağlı olarak yine Şekil 2 a ve b'de verilmiştir. Her iki şekil incelendiği zaman, *P. aeruginosa*'nın PaJC ile karşılaştırıldığında sadece 6. ve 8. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.05$).

4. Tartışma

Çalışmamızda *Pseudomonas aeruginosa*'yı kullanmamızın en önemli nedeni, bu bakterinin büyük çeşitlilik gösteren toksik kimyasalların biyolojik yıkımını gerçekleştirebilmesi ve solventlere en dirençli bakteriler arasında olmasıdır [1-3]. *P. aeruginosa*, alifatik bileşikler mineralleştirilebilmektedir. *P. aeruginosa* suşları, tipik olarak hidrofobik substratlar üzerinde büyüdükleri zaman aktif denitrifiye ediciler ve biyosülfektan (ramnolipidler) üretirler. Ramnolipidler, biyoremediasyonda kullanılan önemli bileşiklerdir. Ramnolipid üreten organizmaların en önemli örnekleri, *Pseudomonas* türleridir. Bu sayede hidrokarbonların hidrofilik hücre duvarlarından penetrasyonu kolaylaşır ve organik maddelerin eriyebilirlikleri artar. *Pseudomonas* türlerinin pek çoğunun organik solventlere toleranslı olmalarının sebebi membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin *trans* izomerlerinde artış sonucunda hücre membranlarının sertlik kazanmasıdır. Bir diğer yol ise, solventlerin membranlardaki aktif pompa sistemi ile dışarı atılmasıdır [19- 21].

Pseudomonas sp. türleri klorobenzoik asit ve diklorobenzoik asidi mineral tuz ortamında yegane karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen birkaç mikroorganizmadan birisidir [22]. VHb içeren *Xanthomonas maltophilia*'nın yabancı tipe göre, benzoik asidi daha fazla biyokütleyle çevirdiği gösterilmiştir [23]. VHb'nin oksijence sınırlı koşullar altında biyoremediasyonu arttırdığı ifade edilmiştir. Özellikle VHb sentezleyen *Pseudomonas* türlerinde benzoik asit yıkımının etkin olarak arttığı belirtilmiştir [24- 25]. Benzer bir çalışmada, benzoik asit yıkımında PaJC'nin, *P. aeruginosa* ile karşılaştırıldığı zaman üreme bakımından daha avantajlı olduğu görülmüştür [13]. Bizim yaptığımız bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara paralel olarak *P. aeruginosa*, VHb taşıyan rekombinantına oranla yüksek havalandırılmalı ortamda üreme bakımından dezavantajlı olarak bulunmuştur. Ancak düşük havalandırılmalı koşullarda *P. aeruginosa* üreme bakımından avantajlı bulunmuştur.



Şekil 2. Düşük havalandırma/ çalkalamalı (açık semboller) ve yüksek havalandırma/ çalkalamalı (kapalı semboller) koşullarda *P. aeruginosa* (kare) ve onun rekombinant suşu PaJC'm (yuvarlak daire) büyüme eğrileri. Düşük havalandırma/ çalkalanma için kültürler, 125 ml erlenlerde 80 ml MM + benzoik asit 50 rpm ile çalkalanırken, yüksek havalandırma/ çalkalama için kültürler 125 ml erlenlerde 20 ml MM + benzoik asit olacak şekilde 200 rpm ile çalkalanmışlardır. Hücreler (a) logaritmik faz ve (b) durağan faz kültürleridir. Her bir veri ortalama üç tekrarlı olarak elde edilmiştir. Ancak hata çubuklarının ortalama değerleri % 10'dan düşük olduğu için verilmemiştir.

Teşekkür

Yazarlar İnönü Üniversitesi'nin bu çalışma için verdiği desteğe (APYB 2002/05) müteşekkirdir.

Kaynaklar

1. P. A. Fish, D. A. Webster, and B. C. Stark, Vitreoscilla hemoglobin enhances the first step in 2, 4- dinitrotoluene degradation in vitro and at low aeration in vivo. *J. Mol. Cat.B: Enz.*, 9, 75-82, 2000.
2. S. C. Lui, D. A. Webster and B. C. Stark, Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonad: Effects on cell growth. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 44, 419-424, 1995.
3. C. Chayabutra, L. K. Ju, Degradation of n- hexadecane and its metabolites by Pseudomonas aeruginosa under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 493-498, 2000.
4. G. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kast, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. S. Wong, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. lorry, M. V. Olsen, Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959-964, 2000.
5. M. T. Madigan, J. Martinko, J. Parker, Brock microbiology and microorganisms. New Jersey (U.S.A), 470-702, 2000.
6. J. G. Leahy, K. D. Tracy, M. H. Eley, Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon- degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 271-276, 2003.
7. M. Bolognesi, D. Bordo, M. Rizzi, C. Tarricone, P. ascenzi, Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 68, 29-68, 1997.
8. H. Geckil, S. Gencer, H. Kahraman, S. O. Erenler, Genetic engineering of Enterobacter aerogenes with Vitreoscilla hemoglobin gene: Cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress. *Res. Microbiol.*, 154, 425-431, 2003.
9. M. Bolgnesi; A. Boffi, M. Coletta, A. Mozzarelli, A. Pesce, C. Tarricone, P. Ascenzi, Anticooperative ligand binding ferric Vitreoscilla homodimeric hemoglobin: Thermodynamic, kinetic, and X- ray crystallographic study. *J. Mol. Biol.*, 291, 637-650, 1999.
10. V. Roos, C. I. J. Andersson, C. Arfvidsson, K. G. Wahlund, L. Bülow, Expression of double Vitreoscilla hemoglobin enhances growth and alters ribosome and tRNA levels in Escherichia coli. *Biotechnol. Prog.*, 18, 652-656, 2002.
11. S. M. Patel, B. C. Stark, K. Hwang, K. L. Dikshit and D. A. Webster, Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderi sp. strain DNT for enhancement of 2, 4- dinitrotoluene degradation. *Biotechnol. Prog.*, 16, 26-30, 2000.
12. M. A. Nasr, K. Hwang, M. Akbas, D. A. Webster and B. C. Stark, Effects of culture on enhancement of 2, 4- dinitrotoluene degradation by Burkholderia engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene. *Biotechnol. Prog.*, 17, 359-361, 2001.
13. J. W. Chung, D. A. Webster, K. R. Pagilla, B. C. Stark, Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing

- stable engineered strains with enhanced bioremediating ability. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 27-33, 2001.
14. C. C. Somerville, S. F. Nishino, J. C. Spain, Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.*, 177, 3837-3842, 1995.
 15. W. H. Noordmand, J. H. J. Wachter, G. J. Boer, D. B. Janssen, The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *J. Biotechnol.*, 94, 195-212, 2002.
 16. S. J. Marshal, G. F. White, Complete denitration of nitroglycerin by bacteria isolated from a wash water soak away. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2622-2626, 2001.
 17. C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, Aerobic degradation of 2,4,6- trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and pentaerythriol tetranitrate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2864-2868, 1998.
 18. C. Pasternak, K. Habertzettl, G. Klug; Thioredoxine is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacters phaeoides*. *J. Bacteriol.*, 181, 100-106, 1999.
 19. M. J. Huertas, E. Duque, L. Molina, R. R. Mora, G. Mosqueda, P. Godoy, B. Christensen, S. Molin, J. L. Ramos, Tolerance to sudden organic solvent shocks by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from toluene polluted sites. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3395-3400, 2000.
 20. N. Rajagopal, Growth of gram negative bacteria in the presence of organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 606-613, 1996
 21. S. Isken, P. M. A. C. Santos, J. A. M. de Bont, Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S 12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 642-647, 1997.
 22. H. G. Schlegel, *General microbiology*. Cambridge, 1987.
 23. S. Liu, D.A. Webster, M. Wei and B. C. Stark, Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 101-105, 1996.
 24. R. K. W. Hwang, M. Raje, K. Kim, B. C. Stark, K. L. Dikshit, D. A. Webster, *Vitreoscilla* hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 276, 24781-24789, 2001.
 25. K. Park, K. Kim, A. J. Howard, B. C. Stark, D. A. Webster, *Vitreoscilla* hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases. *J. Biol. Chem.*, 277, 33324-33327, 2002.